

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **030357**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2018.07.31**

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

(21) Номер заявки  
**201591439**

(22) Дата подачи заявки  
**2014.03.14**

### (54) ПРЕПАРАТЫ ПОЛИПЕПТИДА ФАКТОРА VIII

(31) **61/800,293; 61/817,085; 61/829,884;  
61/839,477; 61/863,860; 61/876,927;  
61/879,955; 61/897,742**

(32) **2013.03.15; 2013.04.29; 2013.05.31;  
2013.06.26; 2013.08.08; 2013.09.12;  
2013.09.19; 2013.10.30**

(33) **US**

(43) **2016.03.31**

(86) **PCT/US2014/029354**

(87) **WO 2014/144795 2014.09.18**

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

(72) Изобретатель:  
**Малони Кевин, Абдул-Фаттах Ахмад,  
Гейдж Дэниел (US)**

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

(56) **WO-A2-2013009627**

**POWELL JERRY S. ET AL.: "Safety and  
prolonged activity of recombinant factor VIII Fc  
fusion protein in hemophilia A patients", 29 March  
2012 (2012-03-29), BLOOD 29 MAR 2012, VOL.  
119, NR. 13, PAGE(S) 3031-3037, XP002727554,  
ISSN: 1528-0020, page 3032, column 2, paragraph 2**

**WO-A1-2010115866**

**WO-A1-9526750**

**WO-A2-2005058283**

**WO-A1-9407510**

**WO-A1-0048635**

**MAHLANGU JOHNNY ET AL.: "Phase 3  
study of recombinant factor VIII Fc fusion protein  
in severe hemophilia A.", BLOOD 16 JAN 2014,  
vol. 123, no. 3, 16 January 2014 (2014-01-16), pages  
317-325, XP002727555, ISSN: 1528-0020, the whole  
document**

**WO-A1-2013057219**

**WO-A1-2014026954**

(57) В изобретении предложен препарат полипептида фактора VIII, например FVIII-Fc, и способы его применения. Полипептид FVIII может представлять собой рекомбинантный белок FVIII, белок FVIII короткого действия или белок FVIII длительного действия. Фармацевтический препарат, содержащий полипептид FVIII, можно применять для индивидуальной профилактики, недельной профилактики, эпизодического (по необходимости) лечения или периоперационного ведения гемофилии.

**B1****030357****030357****B1**

### Область техники

Изобретение в общем случае относится к области терапевтических средств при гемостатических нарушениях.

### Уровень техники

Гемофилия А представляет собой X-сцепленное нарушение свертываемости крови, причиной которого являются мутации и/или делеции в гене фактора VIII (FVIII), что приводит к неполноценной активности FVIII (Peyvandi F. et al. *Haemophilia* 72:82-89 (2006)). Данное заболевание характеризуется спонтанными кровоизлияниями и обильным кровотечением после травм. Со временем повторяющиеся кровоизлияния в мышцы или суставы, которые часто начинаются в раннем детстве, приводят к развитию гемофилической артропатии и необратимому повреждению суставов. Это повреждение является прогрессирующим и может привести к сильному ограничению подвижности суставов, мышечной атрофии и хронической боли (Rodriguez-Merchan E.C., *Semin. Thromb. Hemost.* 29:87-96 (2003)), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки).

Домен A2 необходим для прокоагулирующей активности молекулы фактора VIII. Исследования показывают, что свиной фактор VIII имеет в шесть раз большую прокоагулирующую активность, чем человеческий фактор VIII (Lollar P., and E.T. Parker, *J. Biol. Chem.* 266:12481-12486 (1991)), и что разница в коагулирующей активности человеческого и свиного фактора VIII возникает на основании разницы в аминокислотной последовательности между одним или более остатками в человеческом и свином доменах A2 (Lollar P. et al., *J. Biol. Chem.* 267:23652-23657 (1992)), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки.

Лечение гемофилии А осуществляют путем заместительной терапии, нацеленной на восстановление активности FVIII от 1 до 5% от нормальных уровней для предотвращения спонтанных кровотечений (Mannucci P.M. et al., *N. Engl. J. Med.* 344:1773-1779 (2001)), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Существуют полученные из плазмы и рекомбинантные продукты FVIII, доступные для лечения случаев кровотечений при необходимости или для предотвращения возникновения случаев кровотечений путем профилактического лечения.

Снижение количества летальных исходов, предотвращение повреждения суставов и улучшение качества жизни стали важными достижениями вследствие разработки полученного из плазмы и рекомбинантного FVIII. Длительная защита от появления кровотечений стала бы другим ключевым преимуществом в лечении пациентов с гемофилией А.

### Сущность изобретения

Изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую: (a) полипептид FVIII; (b) один или более стабилизирующих агентов, выбранных из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина или их смеси; (c) хлорид натрия (NaCl); (d) L-гистидин; (e) хлорид кальция; и (f) полисорбата 20 или полисорбата 80. В одном варианте реализации изобретения в фармацевтическую композицию не включены маннитол, глицин, аланин или гидроксипропилкрахмал. В другом варианте реализации изобретения NaCl является единственным объемообразующим агентом. В других вариантах реализации изобретения полипептид FVIII представляет собой полипептид длительного действия или полипептид короткого действия.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы, от около 1,3% (мас./об.) сахарозы до около 2,0% (мас./об.) сахарозы, около 1,33% (мас./об.) сахарозы или около 2,0% (мас./об.) сахарозы, от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы, от около 13 мг/мл до около 20 мг/мл сахарозы, около 13,3 мг/мл сахарозы или около 20,0 мг/мл сахарозы. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 150 mM до около 250 mM NaCl, от около 175 mM до около 225 mM NaCl, от около 200 mM до около 210 mM NaCl, около 205 mM NaCl, от около 8,8 мг/мл до около 14,6 мг/мл NaCl, от около 10 мг/мл до около 13 мг/мл NaCl, около 12,0 мг/мл NaCl, от около 250 mM до около 350 mM NaCl, от около 275 mM до около 325 mM NaCl, около 308 mM NaCl, от около 14,6 мг/мл до около 20,5 мг/мл NaCl, от около 16 мг/мл до около 19 мг/мл NaCl или около 18,0 мг/мл NaCl.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 5 mM до около 15 mM L-гистидина, от около 6,64 mM L-гистидина до около 9,8 mM L-гистидина, от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина или от около 1,03 мг/мл L-гистидина до около 1,55 мг/мл L-гистидина. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 5 mM до около 10 mM хлорида кальция, от около 5,4 mM хлорида кальция до около 8 mM хлорида кальция, от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция или от около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция до около 1,18 мг/мл дигидрата хлорида кальция. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 0,008% (мас./об.) до около 0,025% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80, около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80 или около 0,02 % (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80, от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80, около 0,13% мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80 или около 0,20 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит полипептид rFVIII<sub>FC</sub>, который содержит первую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по

меньшей мере на 90 или 95% идентичную аминокислотам от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90-95% идентичную аминокислотам от 21 до 247 из SEQ ID NO:4. В определенных вариантах реализации изобретения полипептид rFVIIIFc содержит первую субъединицу, содержащую аминокислоты от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислоты от 21 до 247 из SEQ ID NO:4. В определенных вариантах реализации изобретения полипептид FVIII присутствует в фармацевтической композиции в концентрации, составляющей от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл, например 83, 167, 250, 333, 500, 667, 1000, 1333, 1667 или 2000 МЕ/мл полипептида FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FVIII присутствует в фармацевтической композиции в концентрации, составляющей от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, например, 150, 287,5, 431,25, 575, 862,5, 1150, 1725, 2300, 2875 или 3450 МЕ/мл полипептида FVIII.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия; (b) от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы; (c) от около 150 мМ до около 250 мМ NaCl; (d) от около 5 мМ до около 15 мМ L-гистидина; (e) от около 5 мМ до около 10 мМ хлорида кальция; и (f) от около 0,008% (мас./об.) до около 0,025% полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 175 мМ до около 225 мМ NaCl или от около 200 мМ до около 210 мМ NaCl.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит (a) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) около 1,33% (мас./об.) сахарозы; (c) около 205 мМ NaCl; (d) около 6,64 мМ L-гистидина; (e) около 5,4 мМ хлорида кальция; и (f) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы; (c) от около 250 мМ до около 350 мМ NaCl; (d) от около 5 мМ до около 15 мМ L-гистидина; (e) от около 5 мМ до около 10 мМ хлорида кальция; и (f) от около 0,008% (мас./об.) до около 0,025% полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 275 мМ до около 325 мМ NaCl.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) около 150 МЕ/мл, около 287,5 МЕ/мл, около 431,25 МЕ/мл, около 575 МЕ/мл, около 862,5 МЕ/мл, около 1150 МЕ/мл, около 1725 МЕ/мл, около 2300 МЕ/мл, около 2875 МЕ/мл или около 3450 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) около 2,0% (мас./об.) сахарозы; (c) около 308 мМ NaCl; (d) около 9,8 мМ L-гистидина; (e) около 8 мМ хлорида кальция; и (f) около 0,020% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы; (c) от около 8,8 мг/мл до около 14,6 мг/мл NaCl; (d) от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина; (e) от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (f) от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) около 13,3 мг/мл сахарозы; (c) около 12,0 мг/мл NaCl; (d) около 1,03 мг/мл L-гистидина; (e) около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (f) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы; (c) от около 14,6 мг/мл до около 20,5 мг/мл NaCl; (d) от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина; (e) от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (f) от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: (a) около 150 МЕ/мл, около 287,5 МЕ/мл, около 431,25 МЕ/мл, около 575 МЕ/мл, около 862,5 МЕ/мл, около 1150 МЕ/мл, около 1725 МЕ/мл, около 2300 МЕ/мл, около 2875 МЕ/мл или около 3450 МЕ/мл полипептида FVIII; (b) около 20,0 мг/мл сахарозы; (c) около 18,0 мг/мл NaCl; (d) около 1,55 мг/мл L-гистидина; (e) около 1,18 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (f) около 0,20 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В некоторых вариантах реализации в настоящее изобретение включен фармацевтический набор, содержащий: (a) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит (i) полипептид FVIII, (ii) один или более стабилизирующих агентов, выбранных из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина или их смеси; (iii) хлорид натрия (NaCl); (iv) L-гистидин; (v) хлорид кальция; и (vi) полисорбата 20 или полисорбата 80; и (b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций для соединения с лиофилизированным порошком из первого контейнера. В других вариантах реализации изобретения фармацевтический набор содержит: (a) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит (i) около 250 МЕ, около 500 МЕ, около 750 МЕ,

около 1000 МЕ, около 1500 МЕ, около 2000 МЕ, около 3000 МЕ, около 4000 МЕ, около 5000 МЕ или около 6000 МЕ полипептида FVIII, (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг хлорида натрия; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,40 мг дигидрата хлорида кальция; и (v) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и (b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном, чтобы при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера получить раствор, содержащий: (i) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII, соответственно; (ii) около 1,33% (мас./об.) сахарозы; (iii) около 205 mM NaCl; (iv) около 6,64 mM L-гистидина; (v) около 5,4 mM хлорида кальция; и (vi) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации изобретения фармацевтический набор содержит: (a) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит (i) около 250 МЕ, около 500 МЕ, около 750 МЕ, около 1000 МЕ, около 1500 МЕ, около 2000 МЕ, около 3000 МЕ, около 4000 МЕ, около 5000 МЕ или около 6000 МЕ полипептида FVIII, (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг хлорида натрия; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,40 мг дигидрата хлорида кальция; и (v) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и (b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном, чтобы при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера получить раствор, содержащий: (i) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII, соответственно; (ii) около 13,3 мг/мл сахарозы; (iii) около 12,0 мг/мл NaCl; (iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина; (v) около 0,80 мг/мл хлорида кальция; и (vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

Изобретение также включает способ снижения или уменьшения количества случаев кровотечений или лечения или предотвращения состояния кровотечения, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей полипептид FVIII.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведены детали дизайна дозирования в подгруппе с последовательной ФК (группа 1) и сбора ФК проб;

на фиг. 2 - данные по средней наблюдаемой активности FVIII для rFVIII-Fc и rFVIII в динамике по времени: одноэтапный анализ коагулирующей активности (логарифмическая шкала) в подгруппе с последовательной фармакокинетикой. rFVIII-Fc демонстрировал приблизительно на 50% больший период полувыведения и среднее время удержания по сравнению с фактором VIII дикого типа (полипептид FVIII короткого действия) ( $P < 0,001$ ).

#### Подробное описание сущности изобретения

В изобретении предложен препарат, содержащий полипептид фактора VIII, например FVIII-Fc, и способы его применения.

##### I. Определения.

Следует отметить, что в данном описании и в приложенной формуле изобретения употребление единственного числа включает множественные отнесения, если иное четко не предусмотрено контекстом. Форма единственного числа, а также термины "один или более" и "по меньшей мере один" могут взаимозаменяемо употребляться в данном документе.

Употребляемый в данном документе термин "около" обозначает приблизительно, примерно, ориентировочно или в диапазоне. Когда термин "около" употребляется в отношении числового диапазона, он модифицирует этот диапазон, расширяя границы за пределы приведенных числовых значений. В общем случае употребляемый в данном документе термин "около" модифицирует числовое значение путем внесения отклонения, составляющего 10% выше или ниже (больше или меньше) установленного значения.

Кроме того, в контексте данного документа "и/или" следует воспринимать как отдельное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или в отдельности. Таким образом, при употреблении в такой фразе, как "А и/или В", термин "и/или" включает "А и В", "А или В", (только) "А" и (только) "В". Аналогично, при употреблении в такой фразе, как "А, В и/или С", термин "и/или" включает каждый из следующих вариантов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; (только) А; (только) В; (только) С.

Понятно, что если варианты реализации изобретения описаны в данном документе выражением "содержащий", то предусмотрены также аналогичные варианты, описанные в терминах "состоящий из" и/или "преимущественно состоящий из".

Если не указано иное, употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно подразумеваются специалистом в данной области техники, к которой относится это изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press представляют собой общие словари, в которых специалист может найти многие термины, употребляемые в данном описании.

Единицы, приставки и символы приведены в той форме, которая принята в рамках Международной

системы единиц (СИ). Числовые диапазоны включают величины, определяющие указанный диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от amino- до карбокси-. Приведенные в данном документе заглавия не являются ограничениями различных аспектов или вариантов реализации изобретения, которые следует рассматривать в рамках описания в целом. Соответственно, термины, определения которых приведены ниже, более полно определены в рамках полного объема данного изобретения. Аминокислоты обозначены в данном документе как при помощи общеизвестных трехбуквенных символов, так и при помощи однобуквенных символов, рекомендуемых Комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре. Аналогично, нуклеотиды обозначены при помощи общепринятых однобуквенных кодов.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" употребляются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных аминокислотных остатков.

Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" употребляются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды могут представлять собой ДНК, к ДНК РНК, одноцепочечные или двухцепочечные, векторы, плазмиды, фагов или вирусы. Полинуклеотиды включают те, которые приведены в табл. 10, которые кодируют полипептиды из табл. 11 (см. табл. 10). Полинуклеотиды также включают фрагменты полинуклеотидов из табл. 10, например те, которые кодируют фрагменты полипептидов из табл. 11, такие как фактор VIII, Fc, сигнальная последовательность, пропептид и другие фрагменты полипептидов из табл. 11.

Употребляемое в данном документе выражение "введение" означает прописывать или давать субъекту фармацевтическую композицию согласно изобретению, содержащую полипептид фактора VIII, фармацевтически приемлемым путем. Примеры путей введения включают, но не ограничиваются этим, внутривенный, например внутривенную инъекцию и внутривенную инфузию, например через центральный венозный доступ. Дополнительные пути введения включают подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и ингаляционное введение. Преимущества настоящего изобретения включают: улучшение режима лечения; снижение количества приступов кровотечений; усиленную защиту суставов от кровотечений; предотвращение повреждения суставов; снижение заболеваемости; снижение летальности; длительную защиту от кровотечений; снижение частоты тромботических случаев; и улучшение качества жизни.

Термины "длительного действия" и "долгодействующий" употребляются в данном документе взаимозаменяемо. В одном варианте реализации изобретения термин "длительного действия" или "долгодействующий" указывает на то, что активность FVIII в результате введения полипептида FVIII "длительного действия" является более длительной, чем FVIII-активность FVIII дикого типа (например, ADVATE® или полученного из плазмы FVIII ("pdFVIII")). Более "длительную" FVIII-активность можно определить любыми известными в данной области техники методами, например методом анализа aPTT, методом хромогенного анализа, ROTEM®, TGA и т.д. В одном варианте реализации изобретения более "длительная" FVIII-активность может быть продемонстрирована при помощи  $T_{1/2\beta}$  (активности). В другом варианте реализации изобретения более "длительная" FVIII-активность может быть продемонстрирована при помощи уровня антигена FVIII, присутствующего в плазме крови, например, при помощи  $T_{1/2\beta}$  (антигена). В других вариантах реализации изобретения полипептид FVIII длительного действия или долгодействующий полипептид FVIII дольше работает в коагулирующей системе, например, является активным на протяжении более длительного периода по сравнению с полипептидом FVIII дикого типа, т.е., полипептидом, состоящим из аминокислот от 20 до 1457 из SEQ ID NO: 2, т.е. SQ BDD FVIII (REFACTO®), или полипептидом, состоящим из аминокислот от 20 до 2351 из SEQ ID NO: 6 (ADVATE®). Термины "короткого действия" и "короткодействующий" употребляются в данном документе взаимозаменяемо. В одном варианте реализации изобретения термин "короткого действия" или "короткодействующий" указывает на то, что активность FVIII в результате введения полипептида FVIII "короткого действия" является сходной или одинаковой с FVIII-активностью FVIII дикого типа (например, ADVATE® (аминокислоты от 20 до 2351 из SEQ ID NO: 6), REFACTO® (аминокислоты от 20 до 1457 из SEQ ID NO: 2) или полученного из плазмы FVIII ("pdFVIII")) или более короткой чем FVIII-активность полипептида FVIII длительного действия. Более "короткую" FVIII-активность можно определить любыми известными в данной области техники методами, например методом анализа aPTT, методом хромогенного анализа, ROTEM®, TGA и т.д. Типовые полипептиды FVIII короткого действия включают, но не ограничиваются этим, зрелый полипептид FVIII дикого типа (ADVATE®, RECOMBINATE® или HELIXATE®) или полипептиды FVIII с удаленным В-доменом, такие как SQ BDD FVIII (REFACTO® и XYNTHA®), или полипептиды FVIII, содержащие 21 аминокислоту из В-домена (т.е. SFSQNSRHPSPNPPVLKRHQR, SEQ ID NO: 17) (например, NOVOEIGHT®). Употребляемый в данном документе термин "химерный полипептид" означает полипептид, который содержит в своем составе по меньшей мере два полипептида (или их части, такие как подпоследовательности или пептиды) из разных источников. Химерные полипептиды могут содержать два, три, четыре, пять, шесть, семь или более полипептидов или их частей из разных источников, таких как разные гены, разные кДНК или разные виды животных или других организмов. Химерные полипептиды могут содержать один или более линкеров, соединяющих разные полипептиды

или их части. Таким образом, полипептиды или их части могут быть соединены напрямую или они могут быть соединены не напрямую посредством линкеров, или могут реализовываться оба варианта в пределах одного химерного полипептида. Химерные полипептиды могут содержать дополнительные пептиды, такие как сигнальные последовательности и последовательности, такие как 6His и FLAG, которые способствуют очистке или выявлению белка. Кроме того, химерные полипептиды могут содержать аминокислотные или пептидные добавления в N- и/или C-концах. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный полипептид представляет собой полипептид FVIII длительного действия. Типовыми химерными полипептидами согласно изобретению являются химерные полипептиды фактор VIII-FcRn BP, например, полипептиды фактор VIII-Fc, такие как FVIII<sub>h</sub>FC, SEQ ID NO:2 или 6 (табл. 11), содержащие или не содержащие сигнальную последовательность и пропептид.

В контексте данного документа "гибридные" полипептиды и белки означают комбинацию химерного полипептида со вторым полипептидом. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как взаимодействия зарядов или гидрофобные взаимодействия. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством дисульфидной или другой(их) ковалентной(ых) связи(ей). Гибриды описаны в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Также см. патенты США №7404956 и 7348004, каждый из которых в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Второй полипептид может представлять собой вторую копию того же самого химерного полипептида или он может быть неидентичным химерным полипептидом. См., например, табл. 11. В одном варианте реализации изобретения второй полипептид представляет собой полипептид, содержащий партнера по связыванию FcRn. Партнеры по связыванию FcRn связываются с FcRn и защищают содержащую партнера по связыванию FcRn молекулу от катаболизма, таким образом, увеличивая период полувыведения из плазмы. В другом варианте реализации изобретения химерный полипептид представляет собой химерный полипептид фактор VIII-Fc, а второй полипептид преимущественно состоит из Fc, например, рекомбинантный слитый белок rFVIII<sub>h</sub>FC, состоящий из одной молекулы рекомбинантного человеческого FVIII с удаленным В-доменом (BDD-rFVIII), слитой с димерным Fc-доменом человеческого IgG1, без промежуточной линкерной последовательности. Этот гибридный полипептид называется в данном документе мономерным Fc-слитым белком FVIII<sub>h</sub>FC, мономерным гибридом FVIII<sub>h</sub>FC, мономерным гибридным FVIII<sub>h</sub>FC и мономерно-димерным FVII<sub>h</sub>IFc. см. табл. 11A. В Примерах приведены доклинические и клинические данные по этому гибриднему полипептиду. Второй полипептид в гибриде может содержать или преимущественно состоять из последовательности, по меньшей мере на 90 или 95% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 11A(ii), без сигнальной последовательности (аминокислоты от 21 до 247 из SEQ ID NO:4), или по меньшей мере на 90 или 95% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 11A(ii), с сигнальной последовательностью (аминокислоты от 1 до 247 из SEQ ID NO:4). Второй полипептид может содержать или преимущественно состоять из последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 11A(ii), без сигнальной последовательности (аминокислоты от 21 до 247 из SEQ ID NO:4), или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 11A(ii), с сигнальной последовательностью (аминокислоты от 1 до 247 из SEQ ID NO:4). Коагулирующую активность фактора VIII выражают в Международных единицах (ME). Одна ME активности фактора VIII соответствует приблизительно количеству фактора VIII в одном миллилитре нормальной человеческой плазмы. Для определения активности фактора VIII доступно несколько методов анализа, включая одноэтапный анализ коагулирующей активности (активированное частичное тромбопластиновое время; aPTT), время тромбообразования (TGA) и ротационную тромбоэластометрию (ROTEM®). Употребляемый в данном документе в отношении препарата в соответствии с изобретением термин "лиофилизат" означает препарат, который получают методами лиофилизации, известными в данной области техники в чистом виде (per se). Растворитель (например, воду) удаляют путем замораживания с последующей сублимацией в вакууме и десорбцией остатка воды при повышенной температуре. В области техники фармацевтики лиофилизат обычно содержит остаточную влагу на уровне около 0,1-5% (м/м) и находится в виде порошка или физически стабильной таблетки. Лيوфилизат характеризуется быстрым растворением после добавления среды для восстановления.

Употребляемый в данном документе термин "восстановленный препарат" означает препарат, который был лиофилизирован и повторно восстановлен путем добавления разбавителя. Разбавитель может содержать, без ограничений, воду для инъекций (ВДИ), бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), растворы хлорида натрия (например, 0,9% (мас./об.) NaCl), растворы глюкозы (например 5% глюкозу), растворы, содержащие сурфактанты (например, 0,01% полисорбат 20 или полисорбат 80), pH-буференный раствор (например, забуференный фосфатом раствор) и их комбинации. Употребляемое в данном документе выражение "интервал дозирования" означает количество времени, которое проходит между вводимыми субъекту многократными дозами. Таким образом, интервал дозирования можно представить в виде диапазонов. Интервал дозирования в способах согласно изобретению с применением химерного FVIII-FcRn BP, например, химерного FVIII-Fc, может по меньшей мере в от около полутора до восьми раз превышать интервал дозирования, необходимый для эквивалентного количества (в ME/kg)

фактора VIII без FcRn BP, например Fc-части (т.е. полипептида, состоящего из указанного FVIII). Интервал дозирования при введении, например, химерного полипептида фактор VIII-Fc (или гибрида) согласно изобретению, может по меньшей мере в около полутора раз превышать интервал дозирования, необходимый для эквивалентного количества фактора VIII без FcRn BP, например, Fc-части (т.е. полипептида, состоящего из фактора VIII). Интервал дозирования может по меньшей мере в от около полутора до восьми раз превышать интервал дозирования, необходимый для эквивалентного количества фактора VIII без, например, Fc-части (или полипептида, состоящего из фактора VIII).

Употребляемый в данном документе термин "частота дозирования" относится к частоте введения доз полипептида FVIII в заданное время. Частоту дозирования можно представить как количество доз, приходящееся на заданный интервал времени, например один раз в неделю или один раз в две недели.

Употребляемый в данном документе термин "профилактика одного или более эпизодов кровотечений" или "профилактическое лечение" означает введение субъекту полипептида FVIII в многократных дозах на протяжении определенного времени для повышения уровня активности FVIII в плазме субъекта. В одном варианте реализации изобретения "профилактика одного или более эпизодов кровотечений" означает применение полипептида FVIII для предотвращения или ингибирования возникновения одного или более спонтанных или неконтролируемых кровотечений или эпизодов кровотечений или для снижения частоты одного или более спонтанных или неконтролируемых кровотечений или эпизодов кровотечений. В другом варианте реализации изобретения повышенного уровня активности FVIII достаточно, чтобы снизить частоту спонтанных кровотечений или предотвратить кровотечение в случае непредвиденного повреждения. Профилактическое лечение снижает или предотвращает возникновение эпизодов кровотечений, например, таких, которые описаны в параграфе "лечение по необходимости". Профилактическое лечение может быть индивидуализировано, как обсуждается в параграфе "интервал дозирования", например, чтобы скомпенсировать вариабельность между пациентами.

Употребляемый в данном документе термин "приблизительно дважды в неделю" означает приблизительное количество, а "приблизительно дважды в неделю" может включать дважды в одну неделю, например, первую дозу в три дня и вторую дозу в три дня, первую дозу в три дня, а вторую дозу в четыре дня, первую дозу в четыре дня, а вторую дозу в три дня, первую дозу в четыре дня и вторую дозу в четыре дня. Термин "приблизительно дважды в неделю" также может включать каждые три дня, каждые четыре дня или каждые пять дней.

Употребляемый в данном документе термин "приблизительно раз в неделю" означает приблизительное количество, а "приблизительно раз в неделю" может включать каждые семь дней  $\pm$  два дня, т.е. от "каждые пять дней" до "каждые девять дней". Таким образом, частота дозирования "раз в неделю" может соответствовать каждым пяти дням, каждым шести дням, каждым семи дням, каждым восьми дням или каждым девяти дням. Употребляемый в данном документе термин "индивидуализированная профилактика" или "профилактический и индивидуализированный" означает применение полипептида FVIII для индивидуализированного дозирования и/или интервала или частоты дозирования для предотвращения или ингибирования возникновения одного или более спонтанных и/или неконтролируемых кровотечений или эпизодов кровотечений или для снижения частоты одного или более спонтанных и/или неконтролируемых кровотечений или эпизодов кровотечений. В этой заявке в контексте профилактики "индивидуализированный" употребляется как синоним "адаптированному". Например, "индивидуализированная профилактика" также означает "адаптированную профилактику", а "профилактический и индивидуализированный" также означает "профилактический и адаптированный". В одном варианте реализации изобретения "индивидуализированный интервал" включает каждые 3 дня  $\pm$  2 дня, т.е. от "каждый день" до "каждые пять дней". Таким образом, частота дозирования в случае "профилактики с индивидуализированным интервалом" может составлять каждый день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня или каждые пять дней.

Употребляемый в данном документе термин "лечение по необходимости" означает лечение, которое проводится на протяжении короткого периода времени в ответ на существующее патологическое состояние, такое как эпизод кровотечения, или очевидную краткосрочную необходимость, такую как планируемое хирургическое вмешательство. Выражение "лечение по необходимости" взаимозаменяемо употребляется с "эпизодическим" лечением. Патологические состояния, при которых может потребоваться лечение по необходимости, включают эпизод кровотечения, гемартроз, мышечное кровотечение, кровотечение в полости рта, кровоизлияние, кровоизлияние в мышцы, кровоизлияние в полость рта, травму, травму головы, желудочно-кишечное кровотечение, внутричерепное кровотечение, внутрибрюшное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, перелом костей, кровотечение в центральной нервной системе, кровотечение в заглоточном пространстве, кровотечение в забрюшинном пространстве или кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Также включены отличные от перечисленных эпизоды кровотечения. Субъекту может потребоваться хирургическая профилактика, периоперационное ведение или лечение перед хирургическим вмешательством. Такое хирургическое вмешательство включает малое хирургическое вмешательство, обширное хирургическое вмешательство, удаление зубов, тонзилэктомию, другие стоматологические/грудные/лицевые операции, паховое грыжесечение,

синовэктомии, полное замещение коленного сустава, другие замещения суставов, трепанацию черепа, остеосинтез, травматическую хирургию, внутричерепную хирургию, внутрибрюшную хирургию или внутригрудную хирургию. Также включены отличные от перечисленных виды хирургического вмешательства.

Дополнительные патологические состояния, при которых может потребоваться лечение по необходимости, включают кровоизлияние малого объема, гемартрозы, кровоизлияние в поверхностные мышцы, кровоизлияние в мягкие ткани, умеренное кровоизлияние, внутримышечное кровоизлияние или кровоизлияние в мягкие ткани с расслоением, кровоизлияние в слизистую оболочку, гематурию, обширное кровоизлияние, кровоизлияние в глотку, кровоизлияние в заглоточном пространстве, кровоизлияние в забрюшинном пространстве, кровоизлияние в центральной нервной системе, кровоизлияние, порезы, царапины, кровоизлияние в суставы, носовое кровотечение, кровотечение в ротовой полости, кровоточивость десен, внутричерепное кровотечение, внутрибрюшинное кровотечение, спонтанное кровоизлияние малого объема, кровотечение после обширной травмы, умеренные кровоизлияния на коже или спонтанные кровоизлияния в суставы, мышцы, внутренние органы или головной мозг. Дополнительные причины для лечения по необходимости включают необходимость периоперационного ведения в случае хирургического вмешательства или удаления зубов, обширное хирургическое вмешательство, обширную стоматологическую операцию, урологическую операцию, грыжесечение, ортопедическую операцию, такую как замена коленного, тазобедренного или одного из других основных суставов.

Употребляемый в данном документе термин "лечение" означает облегчение или снижение одного или более симптомов болезней или нарушений свертываемости крови, включая, но не ограничиваясь этим, гемофилию В. В одном варианте реализации изобретения "лечение" болезни или нарушения свертываемости крови включает предотвращение появления одного или более симптомов болезни или нарушения свертываемости крови. В случае болезни или нарушения свертываемости крови, причиной которых является дефицит FVIII (например, низкая исходная активность FVIII), термин "лечить" означает FVIII-заместительную терапию. Путем введения субъекту фармацевтической композиции, содержащей полипептид FVIII, у субъекта может быть достигнут и/или поддерживаться остаточный уровень плазменной активности FVIII, составляющий около 1 ME/дл или более 1 ME/дл. В других вариантах реализации изобретения "лечить" означает снижение частоты появления одного или более симптомов болезней или нарушений свертываемости крови, например спонтанных или неконтролируемых эпизодов кровотечений. При этом "лечение" не обязательно должно приводить к излечению.

Употребляемый в данном документе термин "периоперационное ведение" означает применение фармацевтической композиции, содержащей полипептид FVIII, до, одновременно с или после оперативного вмешательства, например хирургической операции. Применение "периоперационного ведения" одного или более эпизодов кровотечений включает хирургическую профилактику до (т.е. дооперационную), во время (т.е. интраоперационную) или после (т.е. постоперационную) хирургического вмешательства в целях предотвращения возникновения одного или более кровотечений или эпизодов кровотечений или снижения или ингибирования спонтанных и/или неконтролируемых эпизодов кровотечений до, во время и после хирургического вмешательства.

В контексте данного документа "исходный уровень" представляет собой наименьший плазменный уровень фактора VIII у субъекта до введения дозы. Плазменные уровни FVIII можно определять для двух временных точек перед дозированием: во время скринингового визита и непосредственно перед дозированием. В альтернативном варианте (a) исходный уровень у пациентов, у которых активность FVIII перед лечением составляет <1%, у которых не выявляется антиген FVIII и которые имеют нонсенс-генотип, может быть определен как 0%, (b) исходный уровень у пациентов, у которых активность FVIII перед лечением составляет <1% и у которых выявляется антиген FVIII, может быть установлен как 0,5%, (c) исходный уровень у пациентов, у которых активность FVIII перед лечением составляет 1-2%, представляет собой Смин (самое низкое значение активности на протяжении ФК исследования), и (d) исходный уровень у пациентов, у которых активность FVIII перед лечением составляет ≥2%, может быть установлен как 2%. Активность, превышающую исходный уровень перед дозированием, можно считать остаточной после применения лекарственного препарата на предыдущем этапе лечения и привести к исходному уровню и вычесть из ФК данных после дозирования rFVIII-Fc.

В контексте данного документа " $T_{1/2\beta}$ " или " $T_{1/2\beta\text{ета}}$ ", или "бета ПП" представляет собой период полувыведения, связанный с фазой элиминации,  $t_{1/2\beta} = (\ln 2) / \text{константа скорости элиминации}$ , связанную с конечной фазой.  $T_{1/2\beta\text{ета}}$  можно определить по активности FVIII или по уровню антигена FVIII в плазме крови.  $T_{1/2\beta\text{ета}}$ , определенное на основании активности, приводят как  $T_{1/2\beta\text{ета}}$  (активности), а  $T_{1/2\beta\text{ета}}$ , определенное на основании уровня антигена FVIII, можно приводить в виде  $T_{1/2\beta\text{ета}}$  (антигена). Как  $T_{1/2\beta\text{ета}}$  (активности), так и  $T_{1/2\beta\text{ета}}$  (антигена) можно приводить в виде диапазонов или среднего геометрического.

В контексте данного документа термин "остаточный" определяет самый низкий уровень плазменной активности FVIII, достигаемый после введения дозы химерного полипептида согласно изобретению или другой молекулы FVIII и перед введением следующей дозы, если оно имеет место. В данном документе термин остаточный взаимозаменяемо употребляется с термином "пороговый". Чтобы рассчитать



остаточный уровень, из измеренных уровней FVIII вычитают исходные уровни FVIII.

Употребляемый в данном документе термин "годовой показатель частоты кровотечений" ("ГПЧК") относится к количеству эпизодов кровотечений (включая спонтанные и травматические кровотечения), произошедших у субъекта на протяжении определенного периода времени, экстраполированные на 1 год. Например, два эпизода кровотечения за шесть месяцев означают, что ГПЧК равен четырем. Медианное значение ГПЧК дает среднюю величину по всем наблюдаемым ГПЧК, показывая, что половина субъектов характеризуется индивидуальным ГПЧК, меньшим или равным медианному, а половина характеризуется ГПЧК, большим или равным медианному.

Употребляемый в данном документе термин "интерквартильный диапазон" ("ИКД") относится к мере статистического разброса и соответствует разнице между верхним и нижним квартилями. В отличие от (полного) диапазона интерквартильный диапазон является робастной статистической характеристикой, для которой пороговая точка составляет 25%, и поэтому он часто является более предпочтительным, чем полный диапазон. В случае симметрического распределения (когда медианное значение соответствует средней линии - среднему значению по первому и третьему квартилям) половина ИКД соответствует абсолютному отклонению медианного значения (АОМЗ). Медианное значение представляет собой соответствующую меру центральной тенденции. В контексте данного документа "субъект" означает человека. В контексте данного документа понятие субъект включает индивида, у которого наблюдался по меньшей мере один эпизод неконтролируемого кровотечения, у которого было диагностировано заболевание или нарушение, связанное с эпизодами неконтролируемых кровотечений, например заболевание или нарушение свертываемости крови, например гемофилия А, который подвержен эпизодам неконтролируемых кровотечений, например гемофилии, или комбинации вышеуказанного. Субъекты также могут включать индивида, для которого существует опасность возникновения одного или более эпизодов неконтролируемых кровотечений перед определенным видом активности, например хирургическим вмешательством, спортивной активностью или любым видом физической активности. Субъект может характеризоваться исходной активностью FVIII, составляющей менее 1%, менее 0,5%, менее 2%, менее 2,5%, менее 3% или менее 4%. Субъекты также включают педиатрических пациентов. Возраст педиатрических субъектов составляет от рождения до 20 лет, предпочтительно от рождения до 18 лет, от рождения до 16 лет, от рождения до 15 лет, от рождения до 12 лет, от рождения до 11 лет, от рождения до 6 лет, от рождения до 5 лет, от рождения до 2 лет или от 2 до 11 лет. В контексте данного документа "терапевтическая доза", "доза", "эффективная доза" или "дозировочное количество" означает дозу, при которой у субъекта, которому вводят фармацевтическую композицию, содержащую полипептид FVIII, достигается остаточный уровень активности FVIII, составляющий по меньшей мере около 1 МЕ/дл или более 1 МЕ/дл. В целях данного изобретения в одном варианте реализации "доза" относится к такому количеству доз, при котором остаточный уровень плазменной активности FVIII поддерживается на уровне, составляющем по меньшей мере около 1 МЕ/дл или более 1 МЕ/дл, по меньшей мере около 2 МЕ/дл или более 2 МЕ/дл, по меньшей мере около 3 МЕ/дл или более 3 МЕ/дл, по меньшей мере около 4 МЕ/дл или более 4 МЕ/дл или по меньшей мере около 5 МЕ/дл или более 5 МЕ/дл на протяжении применения фармацевтической композиции, содержащей полипептид FVIII. В другом варианте реализации изобретения "доза" снижает или уменьшает частоту возникновения кровотечений или нарушений свертываемости крови. В других вариантах реализации изобретения "доза" прекращает имеющееся неконтролируемое кровотечение или эпизод кровотечения. В других вариантах реализации изобретения "доза" предотвращает возникновение спонтанного кровотечения или эпизодов кровотечений у субъекта, подверженного такому спонтанному кровотечению или эпизодам кровотечений. "Доза" или "терапевтическая доза" не обязательно излечивает гемофилию.

Термин "целевой сустав" определяется как основной сустав (например, тазобедренный, локтевой, лучезапястный, плечевой, коленный и голеностопный), в котором происходит повторяемое кровотечение (с частотой  $\geq 3$  эпизодов кровотечения в один и тот же сустав за период из 6 последовательных месяцев).

Употребляемый в данном документе термин "эпизод кровотечения" соответствует стандартному определению эпизода кровотечения. Эпизод кровотечения начинается с первого признака кровотечения и заканчивается через 72 ч после последнего лечения кровотечения, в пределах этого периода любые симптомы кровотечения в одном и том же месте и инъекции, разделенные менее чем или 72 ч, считаются относящимися к одному и тому же эпизоду кровотечения. Любая инъекция с целью лечения эпизода кровотечения, проведенная более чем через 72 ч после предшествующей, считается первой инъекцией с целью лечения нового эпизода кровотечения в том же самом месте. Любое кровотечение, происходящее в другом месте, считается отдельным эпизодом кровотечения вне зависимости от времени, прошедшего после последней инъекции. Это определение было предложено Подкомитетом по стандартам и критериям, подкомитетом FVIII/FIX Международного общества по тромбозу и гемостазу и применялось в исследованиях гемофилии мультицентра PedNet.

Употребляемый в данном документе термин "годовые показатели частоты кровотечений" (ГПЧК) относится к количеству эпизодов кровотечения, которое в случае каждого пациента было пересчитано на год при помощи следующей формулы:

$$\text{ГПЧК} = \frac{\text{Количество эпизодов кровотечений за эффективный период}}{\text{Общее количество дней за эффективный период}} \times 365,25$$

В контексте данного документа "вариант" относится к полинуклеотиду или полипептиду, отличающемуся от оригинального полинуклеотида или полипептида, но сохраняющему его важные свойства, например, коагулирующую активность фактора VIII или активность Fc (связывания FcRn). В общем случае варианты в целом очень сходны и во многих областях идентичны оригинальному полинуклеотиду или полипептиду. Варианты включают полипептидные и полинуклеотидные фрагменты, делеции, инсерции и модифицированные версии оригинальных полипептидов.

## II. Фармацевтическая композиция.

Изобретение относится к полипептиду FVIII, полученному в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может быть получена для применения на людях. Полипептид FVIII может представлять собой полипептид FVIII короткого действия или полипептид FVIII длительного действия. Фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменники, окись алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, вторичный кислый фосфат натрия, вторичный кислый фосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропилен блок-полимеры, полиэтиленгликоль и ланолин. В данной области техники известны разнообразные способы получения препарата согласно изобретению.

В определенных предложенных в данном документе препаратах полипептид FVIII получен в виде стерильного, не содержащего консервантов, непирогенного, лиофилизованного порошка или таблетки от белого до грязно-белого цвета для внутривенного (BV) введения. Препарат может быть предоставлен во флаконе для разового использования.

В определенных вариантах реализации изобретения препарат полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII(Fc)) предоставлен во флаконе для разового использования, рассчитанном на то, чтобы после восстановления соответствующим количеством разбавителя содержать около 83 МЕ/мл, 167 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 333 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 667 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл, 1333 МЕ/мл, 1667 МЕ/мл или 2000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия. В определенных вариантах реализации изобретения, в которых разбавитель добавляют до конечного объема, составляющего около 3 мл, флакон для разового использования может номинально содержать около 250, около 500, около 750, около 1000, около 1500, около 2000, около 3000, около 4000, около 5000 или около 6000 Международных единиц (МЕ) полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII(Fc)).

В определенных вариантах реализации изобретения препарат кроме активного полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII(Fc)) содержит: сахарозу (которая может действовать как стабилизатор), хлорид натрия (который может действовать как объемобразующий агент), L-гистидин (который может действовать как буфер), хлорид кальция и полисорбат 20 или полисорбат 80 (который может действовать как стабилизатор). Препарат предоставляется вместе с разбавителем, содержащим стерильный раствор хлорида натрия. В определенных вариантах реализации изобретения разбавитель предоставляется в предварительно заполненном шприце.

Соответственно, в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая определенное количество полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII(Fc)) (в МЕ) вместе со вспомогательными веществами, а именно сахарозой, NaCl, L-гистидином, хлоридом кальция и полисорбатом 20 или полисорбатом 80. Предложенные в данном документе композиции содержат различные концентрации различных вспомогательных веществ, при этом концентрации могут быть выражены разным образом. Например, концентрация заданного вспомогательного вещества может быть выражена в виде молярной концентрации (например, в М или mM), в виде процентного соотношения масса/объем (например, в граммах на 100 мл разбавителя) или в виде миллиграммов на миллилитр (мг/мл). Предложенные в данном документе препараты могут содержать определенные количества различных вспомогательных веществ с уровнем точности в диапазоне от приблизительного, например, в случае, когда концентрации выражены с точностью до одной значащей цифры (например, около 0,1% (мас./об.)), или более точно, например, до 2, 3, 4, 5 или 6 значащих цифр (например, около 3,88 мг/мл с точностью до трех значащих цифр). Необходимый уровень точности может варьироваться в зависимости, например, от требований данного регуляторного органа или производственного процесса. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит восстановленный препарат, который может быть предоставлен в виде лиофилизата, необязательно, с прилагающимся разбавителем.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл rFVIII(Fc, например, 83, 167, 250, 333, 500, 667, 1000, 1333, 1667

или 2000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc). В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит 83, 167, 250, 333, 500, 667, 1000, 1333, 1667 или 2000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc) в препарате, содержащем около 13,3 мг/мл или около 1,33% (мас./об.) сахарозы, около 12,0 мг/мл или около 205 мМ NaCl, около 1,03 мг/мл или около 6,64 мМ L-гистидина, около 0,80 мг/мл или около 5,4 мМ дигидрата хлорида кальция и около 0,13 мг/мл или около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В определенных вариантах реализации изобретения перед лиофилизацией фармацевтическая композиция содержит от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл rFVIIIc, например, 150, 287,5, 431,25, 575, 862,5, 1150, 1725, 2300, 2875 или 3450 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc). В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит 150, 287,5, 431,25, 575, 862,5, 1150, 1725, 2300, 2875 или 3450 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc) в препарате, содержащем около 20,0 мг/мл или около 2,0% (мас./об.) сахарозы, около 18,0 мг/мл или около 308 мМ NaCl, около 1,55 мг/мл или около 9,8 мМ L-гистидина, около 1,18 мг/мл или около 8,0 мМ дигидрата хлорида кальция и около 0,2 мг/мл или около 0,02% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое количество сахарозы. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы, предпочтительно от около 1,3% (мас./об.) до около 2% сахарозы (мас./об.), например около 1,33% (мас./об.) сахарозы или около 2,0% (мас./об.) сахарозы. В определенных родственных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы, предпочтительно от около 13 мг/мл до около 20 мг/мл сахарозы, например около 13,3 мг/мл сахарозы или около 20,0 мг/мл сахарозы. В других вариантах реализации изобретения вместо или в комбинации с сахарозой при таких концентрациях можно использовать стабилизирующие агенты, такие как трегалоза, раффиноза и/или аргинин.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 150 мМ до около 250 мМ NaCl, от около 175 мМ до около 225 мМ NaCl и от около 200 мМ до около 210 мМ NaCl, например, около 205 мМ NaCl. В определенных родственных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 8,8 мг/мл до около 14,6 мг/мл NaCl, от около 10 мг/мл NaCl до около 13 мг/мл, например, около 12,0 мг/мл NaCl. В определенных вариантах реализации изобретения NaCl предоставляется в необходимой концентрации в разбавляющем растворе, в котором восстанавливают лиофилизат, содержащий полипептид FVIII (например, полипептид FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc). В другом варианте реализации изобретения композиции согласно изобретению не содержат объемобразующих агентов, таких как маннитол, глицерин, аланин и/или гидроксипропилкрахмал. В других вариантах реализации изобретения NaCl является единственным объемобразующим агентом.

В определенных вариантах реализации изобретения перед лиофилизацией фармацевтическая композиция содержит от около 250 мМ до около 350 мМ NaCl, от около 275 мМ до около 325 мМ NaCl, например, около 308 мМ NaCl. В определенных родственных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 14,6 мг/мл до около 20,5 мг/мл NaCl, от около 16 мг/мл до около 19 мг/мл, например, около 18,0 мг/мл NaCl.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое количество L-гистидина. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 5 мМ до около 15 мМ L-гистидина, например около 6,64 мМ L-гистидина или около 9,8 мМ L-гистидина. В определенных родственных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина, например около 1,03 мг/мл L-гистидина или около 1,55 мг/мл L-гистидина. В определенных вариантах реализации изобретения L-гистидин предоставляется в виде части лиофилизата, который, после восстановления соответствующим количеством разбавителя обеспечивает необходимую концентрацию L-гистидина.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое количество хлорида кальция. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 5 мМ до около 10 мМ хлорида кальция, например, около 5,4 мМ хлорида кальция или около 8 мМ хлорида кальция. В определенных родственных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция, например около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция или около 1,18 мг/мл дигидрата хлорида кальция. В определенных вариантах реализации изобретения хлорид кальция предоставляется в виде части лиофилизата, который после восстановления соответствующим количеством разбавителя обеспечивает необходимую концентрацию хлорида кальция.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фар-

[illegible]

зы; около 205 мМ NaCl; около 6,64 мМ L-гистидина; около 5,4 мМ хлорида кальция и около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 1,33% (мас./об.) сахарозы; около 205 мМ NaCl; около 6,64 мМ L-гистидина; около 5,4 мМ хлорида кальция и около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 83 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 1673 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 250 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 333 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 500 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 667 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 1000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 1333 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В некоторых вариантах реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 1667 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В других вариантах реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>); около 13,3 мг/мл сахарозы; около 12,0 мг/мл NaCl; около 1,03 мг/мл L-гистидина; около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и около 0,10 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В изобретении также предложены компоненты фармацевтического набора. Такой набор содержит один или более контейнеров и необязательные приспособления. Предложенный в данном документе набор облегчает введение эффективного количества полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIII<sub>Fc</sub>) нуждающемуся в этом субъекту. В определенных вариантах реализации изобретения набор облегчает введение полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>) путем внутривенной инфузии. В определенных вариантах реализации изобретения набор облегчает самостоятельное введение полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>) путем внутривенной инфузии.

В определенных вариантах реализации в изобретении предложен фармацевтический набор, содержащий: первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок или таблетку, при этом порошок или таблетка содержит: (i) полипептид FVIII (например, полипептид FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>Fc</sub>), (ii) сахарозу (и/или трегалозу, раффинозу или аргинин); (iii) NaCl; (iv) L-гистидин; (v) дигидрат хлорида кальция; и (vi) полисорбат 20 или полисорбат 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций для соединения с лиофилизированным порошком из первого контейнера. В определенных вариантах реализации изобретения предложен разбавитель в

объеме, достаточном для получения 3 мл препарата полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc) с необходимыми свойствами, как описано в данном документе. В определенных вариантах реализации изобретения второй контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц в соединении с поршнем, который обеспечивает возможность добавления разбавителя в первый контейнер, восстановления содержимого первого контейнера и обратного набора в шприц. В определенных вариантах реализации изобретения в наборе дополнительно предложен адаптер для подсоединения шприца к первому контейнеру. В определенных вариантах реализации изобретения в наборе дополнительно предложена игла и инфузионная трубка для подсоединения с шприцу, содержащему восстановленный препарат полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc), чтобы обеспечить возможность ВВ инфузии препарата.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен полипептид FVIII (например, полипептид FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc) в общем количестве, составляющем от около 200 ME до около 6000 ME, например около 250 ME, около 500 ME, около 750 ME, около 1000 ME, около 1500 ME, около 2000 ME, около 3000 ME, около 4000 ME, около 5000 ME или около 6000 ME. В одном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 250 ME полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 80 ME/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc), (ii) около 1,33% (мас./об.) сахарозы; (iii) около 205 mM NaCl; (iv) около 6,64 mM L-гистидина; (v) около 5,4 mM хлорида кальция; и (vi) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 500 ME полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIIIc), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 167 ME/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIIIc), (ii) около 1,33% (мас./об.) сахарозы; (iii) около 205 mM NaCl; (iv) около 6,64 mM L-гистидина; (v) около 5,4 mM хлорида кальция; и (vi) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 750 ME полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIIIc), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 250 ME/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIIIc), (ii) около 1,33% (мас./об.) сахарозы; (iii) около 205 mM NaCl; (iv) около 6,64 mM L-гистидина; (v) около 5,4 mM хлорида кальция; и (vi) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 1000 ME полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIIIc), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 333 ME/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIIIc), (ii) около 1,33% (мас./об.) сахарозы; (iii) около 205 mM NaCl; (iv) около 6,64 mM L-гистидина; (v) около 5,4 mM хлорида кальция; и (vi) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80. В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 1500 ME полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIIIc), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при









действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 1000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 13,3 мг/мл сахарозы; (iii) около 12,0 мг/мл NaCl; (iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина; (v) около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 4000 МЕ полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 1333 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 13,3 мг/мл сахарозы; (iii) около 12,0 мг/мл NaCl; (iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина; (v) около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 5000 МЕ полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 1667 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 13,3 мг/мл сахарозы; (iii) около 12,0 мг/мл NaCl; (iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина; (v) около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В дополнительном варианте реализации изобретения предложен фармацевтический набор, который содержит первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит: (i) около 6000 МЕ полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 40 мг сахарозы; (iii) около 36 мг NaCl; (iv) около 3,1 мг L-гистидина; (v) около 2,4 мг дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего: (i) около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например rFVIII<sub>IFc</sub>), (ii) около 13,3 мг/мл сахарозы; (iii) около 12,0 мг/мл NaCl; (iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина; (v) около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и (vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В определенных вариантах реализации изобретения первый контейнер из предложенного в данном документе фармацевтического набора представляет собой стеклянный флакон, закрытый резиновой пробкой. В определенных вариантах реализации изобретения второй контейнер из предложенного в данном документе фармацевтического набора представляет собой корпус шприца, соединенный с поршнем. В определенных вариантах реализации изобретения шприц представляет собой предварительно заполненный шприц, содержащий разбавитель. В определенных вариантах реализации изобретения предложенный в данном документе фармацевтический набор дополнительно содержит адаптер для соединения стеклянного флакона с корпусом шприца. В определенных вариантах реализации изобретения предложенный в данном документе фармацевтический набор дополнительно содержит инфузионную трубку, соединенную с иглой, для подсоединения к шприцу, подходящему для внутривенной инфузии.

В определенных вариантах реализации изобретения необходимая доза полипептида FVIII (например, полипептида FVIII длительного действия или короткого действия, например, rFVIII<sub>IFc</sub>) может быть достигнута путем применения одного из предложенных в данном документе фармацевтических наборов. В определенных вариантах реализации изобретения для достижения необходимой дозы можно применять более одного фармацевтического набора. В данном документе предложен способ комбинирования или объединения препаратов, содержащихся в двух или более предложенных в данном документе фармацевтических наборах, с целью достижения необходимой дозы. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FVIII для фармацевтической композиции представляет собой полипептид FVIII короткого действия. В других вариантах реализации изобретения полипептид FVIII для фармацевтической композиции представляет собой полипептид FVIII длительного действия.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FVIII длительного действия в фарма-

цветической композиции содержит часть фактора VIII и часть, не относящуюся к фактору VIII, например, гетерологичный компонент. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент способен увеличивать *in vivo* или *in vitro* период полувыведения полипептида FVIII. Типовые не относящиеся к фактору VIII части включают, но не ограничиваются этим, Fc, альбумин, последовательность PAS, трансферрин, СТР (28-аминокислотный С-терминальный пептид (СТР) человеческого хорионического гонадотропина (hCG) с 4 О-гликанами), полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), альбумин-связывающий полипептид, альбумин-связывающие небольшие молекулы или любые их комбинации. Типовые полипептиды длительного действия согласно изобретению включают, например, полипептиды фактора VIII-Fc, полипептиды фактора VIII-альбумин, полипептиды фактора VIII-PAS, полипептиды фактора VIII-трансферрин, полипептиды фактора VIII-СТР, полипептиды фактора VIII-ПЭГ, полипептиды фактора VIII-ГЭК, полипептиды фактора VIII-альбумин-связывающий полипептид или полипептиды фактора VIII-альбумин-связывающая небольшая молекула.

Фактор VIII (часть фактора VIII полипептида FVIII длительного действия или FVIII полипептида FVIII короткого действия) может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 11 без сигнальной последовательности (аминокислоты от 20 до 1457 из SEQ ID NO:2; и аминокислоты от 20 до 2351 из SEQ ID NO:6), при этом часть фактора VIII обладает активностью фактора VIII. Фактор VIII (часть фактора VIII химерного полипептида) может быть идентичным аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 11 без сигнальной последовательности (аминокислоты от 20 до 1457 из SEQ ID NO:2; и аминокислоты от 20 до 2351 из SEQ ID NO:6).

Фактор VIII (часть фактора VIII полипептида FVIII длительного действия или FVIII полипептида FVIII короткого действия) может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 11 с сигнальной последовательностью (аминокислоты от 1 до 1457 из SEQ ID NO:2; и аминокислоты от 1 до 2351 из SEQ ID NO:6), при этом часть фактора VIII обладает активностью фактора VIII. Фактор VIII (часть фактора VIII полипептида FVIII длительного действия или полипептида FVIII короткого действия) может быть идентичным аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 11 с сигнальной последовательностью (аминокислоты от 1 до 1457 из SEQ ID NO:2; и аминокислоты от 1 до 2351 из SEQ ID NO:6).

Полипептид длительного действия может содержать последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 11A(i) без сигнальной последовательности (аминокислоты от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2), или по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 11A(i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты от 1 до 1684 из SEQ ID NO:2), при этом последовательность обладает активностью фактора VIII. Активность фактора VIII можно определить при помощи анализа активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT), хромогенного анализа или другими известными способами. Полипептид FVIII длительного действия может содержать последовательность, идентичную аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 11A(i) без сигнальной последовательности (аминокислоты от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2), или идентичную аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 11A(i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты от 1 до 1684 из SEQ ID NO:2).

Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают фактор VIII, слитый с одним или более полипептидами альбумина, альбумин-связывающими полипептидами или альбумин-связывающими небольшими молекулами. В одном варианте реализации изобретения альбумин является человеческим альбумином. Альбумин или альбумин-связывающий белок может быть присоединен как к N-терминальному окончанию FVIII, так и к С-терминальному окончанию FVIII, или вставлен между двумя аминокислотами в FVIII. Примеры альбумина, например, его фрагменты, которые можно использовать в настоящем изобретении, являются известными. См., например, патент США №7592010; патент США №6686179; и Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009), которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Альбумин-связывающие полипептиды могут включать, без ограничений, бактериальные альбумин-связывающие домены, альбумин-связывающие пептиды или альбумин-связывающие фрагменты антител, которые могут связываться с альбумином. Примером бактериального альбумин-связывающего домена является домен 3 из стрептококкового протеина G, раскрытый в Kraulis et al., FEBS Lett. 378:190-194 (1996) и Linhult et al., Protein Sci. 11:206-213 (2002). Примеры альбумин-связывающих пептидов включают группу пептидов, содержащих коровью последовательность DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 7). См., например, Dennis et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002). Примеры альбумин-связывающих фрагментов антител раскрыты в Muller and Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9:319-326 (2007); Roovers et al., Cancer Immunol. Immunother. 56:303-317 (2007) и Holt et al., Prot. Eng. Design Sci., 21:283-288 (2008), которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных аспектах полипептид FVIII длительного действия согласно изобретению содержит

по меньшей мере один участок присоединения неполипептидной небольшой молекулы, варианта или производного, которые могут связывать альбумин. Примером таких альбумин-связывающих компонентов является 2-(3-малеимидопропанамидо)-6-(4-(4-йодфенил)бутанамидо)гексаноат (метка "Albu"), раскрытый в Trusset et al., *Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009).

Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают фактор VIII, слитый по меньшей мере с одним С-терминальным пептидом (СТР)  $\beta$ -субъединицы человеческого хорионического гонадотропина или его фрагмента, варианта или производного. СТР может быть слит с фактором VIII как в N-терминальном окончании FVIII, так и в С-терминальном окончании FVIII, или вставлен между двумя аминокислотами в FVIII. Известно, что один или более пептидов СТР, слитых с или вставленных в рекомбинантный белок, увеличивают *in vivo* период полувыведения этого белка. См., например, патент США №5712122, в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки. Типовые пептиды СТР включают DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 8) или SSSSKAPPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 9). См., например, заявку на патент США №US 2009/0087411 A1, включенную посредством ссылки.

Как обсуждалось выше, типовые полипептиды FVIII длительного действия также включают фактор VIII, слитый по меньшей мере с одной последовательностью PAS или ее фрагментом, вариантом или производным. Последовательность PAS может быть слита как с N-терминальным окончанием FVIII, так и с С-терминальным окончанием FVIII, или вставлена между двумя аминокислотами в FVIII. В контексте данного документа пептид PAS или последовательность PAS означает аминокислотную последовательность, содержащую главным образом остатки аланина и серина или содержащую главным образом остатки аланина, серина и пролина, при этом аминокислотная последовательность принимает произвольную спиральную конформацию в физиологических условиях. Соответственно, последовательность PAS представляет собой строительный блок, аминокислотный полимер или последовательность-кассету, содержащую, преимущественно состоящую или состоящую из аланина, серина и пролина, которую можно использовать как часть гетерологичного компонента в химерном белке. Аминокислотный полимер также может принимать произвольную спиральную конформацию в случае добавления в последовательность PAS остатков, отличных от аланина, серина и пролина, в качестве неосновных составляющих. Под "неосновным составляющим" подразумевается то, что аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, можно добавлять в последовательность PAS до определенной степени, например до около 12%, т.е. около 12 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 10%, до около 9%, до около 8%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, т.е. около 2% или около 1% аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val. В физиологических условиях пептид PAS принимает произвольную спиральную конформацию и тем самым может опосредовать повышение *in vivo* и/или *in vitro* стабильности рекомбинантного белка согласно изобретению и обладает прокоагулирующей активностью.

Неограничивающие примеры пептидов PAS включают ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 10), AAPASPAAPASPAAPAPS (SEQ ID NO: 11), APSSPSAPSSPSASPSS (SEQ ID NO: 12), APSSPSAPSSPSAPSPS (SEQ ID NO: 13), SSPSAPSSPSAPSSPSA (SEQ ID NO: 14), AAPASPAAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 15), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 16) или любые их варианты, производные, фрагменты или комбинации. Дополнительные примеры последовательностей PAS известны из, например, заявки на патент США №2010/0292130 A1 и заявки согласно PCT №WO 2008/155134 A1. Европейский выданный патент EP 2173890.

Как обсуждалось выше, типовые полипептиды FVIII длительного действия также включают фактор VIII, слитый по меньшей мере с одним пептидом трансферрина или его фрагментом, вариантом или производным. По меньшей мере один пептид трансферрина может быть слит как с N-терминальным окончанием FVIII, так и с С-терминальным окончанием FVIII, или вставлен между двумя аминокислотами в FVIII. Любой трансферрин может быть слит с или вставлен в рекомбинантный белок FVIII согласно изобретению. В качестве примера можно привести человеческий Tf (Tf) дикого типа, представляющий собой 679-аминокислотный белок с массой приблизительно в 75 кДа (не учитывая гликозилирования) с двумя основными доменами, N (около 330 аминокислот) и C (около 340 аминокислот), которые образуются вследствие дупликации гена. См. номера доступа в GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM039847 и S95936 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Трансферрин переносит железо посредством опосредованного рецептором трансферрина (TfR) эндоцитоза. После высвобождения железа в эндосомальный компартмент и возвращения комплекса Tf-TfR на клеточную поверхность Tf снова высвобождается во внеклеточное пространство для осуществления следующего цикла переноса железа. Tf обладает длительным периодом полувыведения, который составляет 14-17 дней (Li et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002)). Белки слияния трансферрина изучали в отношении продления периода полувыведения, нацеленной доставки в терапии рака, пероральной доставки и пролонгированной активации инсулина (Brandsma et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 230-238 (2011); Bai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292-7296 (2005); Kim et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682-692

(2010); Wang et al., J. Controlled Release 155:386-392(2011)).

Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают фактор VIII, слитый по меньшей мере с одним полиэтиленгликолем (ПЭГ) компонентом.

ПЭГилированный FVIII может относиться к конъюгату, образуемому между FVIII и по меньшей мере одной молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ является коммерчески доступным в целом ряде молекулярных масс и средних диапазонов молекулярных масс. Типичные примеры средних диапазонов молекулярных масс ПЭГ включают, но не ограничиваются этим, около 200, около 300, около 400, около 600, около 1000, около 1300-1600, около 1450, около 2000, около 3000, около 3000-3750, около 3350, около 3000-7000, около 3500-4500, около 5000-7000, около 7000-9000, около 8000, около 10000, около 8500-11500, около 16000-24000, около 35000, около 40000, около 60000 и около 80000 Да. Эти средние молекулярные массы приведены просто в качестве примеров и не являются каким-либо образом ограничивающими.

Применимый в изобретении полипептид FVIII длительного действия может быть ПЭГилированным и содержать моно- или поли- (например, 2-4) ПЭГ-компоненты. ПЭГилирование можно проводить при помощи любой из известных в данной области техники реакций ПЭГилирования. Способы получения ПЭГилированного белка в общем случае включают (i) осуществление реакции полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реактивный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, в которых пептид согласно изобретению присоединяется к одной или более группам ПЭГ; и (ii) получение продукта(ов) реакции. В общем случае оптимальные реакционные условия определяются от случая к случаю на основании известных параметров и желаемого результата. Существует большое количество способов присоединения ПЭГ, доступных специалистам в данной области техники, например Malik F et al., *Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992); Европейские патенты №EP 0401384, EP 0154316 и EP 0401384; и международные патентные заявки №WO 92/16221 и WO 95/34326. В качестве неограничивающего примера варианты FVIII могут содержать цистеиновые замещения в одном или более инсерционных участках FVIII, а цистеины могут быть дополнительно конъюгированы с ПЭГ полимером. См. Mei et al., *Blood* 116:270-279 (2010) и патент США № 7632921, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Как обсуждалось выше, типовые полипептиды FVIII длительного действия также включают фактор VIII, слитый по меньшей мере с одним полимером гидроксиптилкарахмала (ГЭК). ГЭК представляет собой производное амилопектина природного происхождения и разрушается в организме альфа-амилазой. ГЭК проявляет преимущественные биологические свойства и используется как агент, восполняющий объем крови, и в гемодилюционной терапии в клинических условиях. См., например, Sommermeyer et al., *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987); и Weidler et al., *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991).

ГЭК характеризуется главным образом распределением молекулярной массы и степенью замещения. ГЭК имеет среднюю молекулярную массу (среднюю массу), составляющую от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа или от 4 до 75 кДа. Гидроксиптилкарахмал может дополнительно характеризоваться молярной степенью замещения, составляющей от около 0,1 до 3, от 0,1 до 2, от 0,1 до 0,9 или от 0,1 до 0,8, и соотношением между C2:C6 замещением в диапазоне от 2 до 20 по отношению к гидроксиптильным группам. VOLUVEN® от Fresenius представляет собой ГЭК с молекулярной массой, составляющей около 130 кДа. VOLUVEN® представляет собой искусственный коллоид, применяемый, например, для восполнения объема, которое используется в целях терапии и профилактики гиповолемии. Существует большое количество способов присоединения ГЭК, доступных специалистам в данной области техники, например, способы, аналогичные описанным выше способам присоединения ПЭГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FVIII длительного действия, содержащий часть FVIII, имеет увеличенный период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) по сравнению с полипептидом, состоящим из той же самой части FVIII, но без не относящейся к FVIII части. Полипептид FVIII длительного действия с увеличенным  $t_{1/2}$  может называться в данном документе долгодействующим FVIII. Полипептиды химерного фактора FVIII длительного действия включают, например, фактор VIII, слитый с Fc (включая, например, полипептиды химерного фактора VIII в форме гибрида, такого как мономер-димерный гибрид FVIII-Fc; см. примеры, табл. 11A; и патенты США №7404956 и 7348004), и фактор VIII, слитый с альбумином.

В контексте данного документа полипептид фактора VIII представляет собой функциональный полипептид фактора VIII в своей нормальной роли в коагуляции, если не указано иное. Таким образом, термин фактор VIII включает являющиеся функциональными варианты полипептиды. Белки фактора VIII могут быть человеческими, свиными, собачьими и мышинными белками фактора VIII. Известны полноразмерные полипептидные и полинуклеотидные последовательности, а также многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные версии. Примеры последовательностей человеческого фактора VIII приведены в виде подпоследовательностей в SEQ ID NO: 2 или 6 (табл. 11). Полипептиды фактора VIII включают, например, полноразмерный фактор VIII, полноразмерный фактор VIII минус Met в N-конце, зрелый фактор VIII (минус сигнальная последовательность), зрелый фактор VIII с дополнительным Met в N-конце и/или фактор VIII с полным или частичным удалением В-домена. Варианты фактора

VIII включают удаления В-домена, как частичные, так и полные.

Известно очень много функциональных вариантов фактора VIII, что обсуждается выше и ниже по тексту. Кроме того, у пациентов с гемофилией были выявлены сотни нефункциональных мутаций в факторе VIII и было определено, что действие этих мутаций на функцию фактора VIII связано в большей степени с тем, где они находятся в пределах 3-мерной структуры фактора VIII, чем с природой замещения (Cutler et al., Hum. Mutat. 79:274-8 (2002)), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки. Кроме того, сравнение фактора VIII человека и других видов позволило выявить консервативные остатки, которые, вероятно, необходимы для функционирования (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); US 6251632), в полном объеме включенные в данный документ посредством ссылки.

Ген человеческого фактора VIII 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), которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки, а аминокислотная последовательность была получена по кДНК. Capon et al., патент США №4965199, в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки, раскрывает метод рекомбинантных ДНК для получения фактора VIII в клетках-хозяевах млекопитающих и метод очистки человеческого фактора VIII. Сообщалось об экспрессии человеческого фактора VIII в клетках CHO (клетки яичников китайского хомяка) и ВНК (клетки почек новорожденного хомяка). Человеческий фактор VIII был модифицирован с целью удаления части или всего В-домена (патенты США №4994371 и 4868112, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки), и также было проведено замещение В-домена человеческого фактора VIII В-доменом человеческого фактора V (патент США №5004803, в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки). Последовательность кДНК, кодирующая человеческий фактор VIII, и прогнозируемая аминокислотная последовательность приведены, соответственно, в SEQ ID NO:1 и 2 заявке на патент США №2005/0100990, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки.

В патенте США №5859204 авторства Lollar J.S., в полном объеме включенном в данный документ посредством ссылки, сообщается о функциональных мутантах фактора VIII, обладающих сниженной антигенностью и сниженной иммунореактивностью. В патенте США №6376463 авторства Lollar J.S., в полном объеме включенном в данный документ посредством ссылки, также сообщается о мутантах фактора VIII, обладающих сниженной иммунореактивностью. В заявке на патент США №2005/0100990 авторства Saenko et al., в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки, сообщается о функциональных мутантах в домене A2 фактора VIII.

Большое количество функциональных молекул фактора VIII, включая удаления В-домена, раскрыто в следующих патентах: US 6316226 и US 6346513, которые оба приписаны Baxter; US 7041635, приписанный In2Gen; US 5789203, US 6060447, US 5595886 и US 6228620, приписанные Chiron; US 5972885 и US 6048720, приписанные Biovitrum, US 5543502 и US 5610278, приписанные Novo Nordisk; US 5171844, приписанный ImMuno Ag; US 5112950, приписанный Transgene S.A.; US 4868112, приписанный Genetics Institute, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Были опубликованы данные по последовательности свиного фактора VIII (Toole J.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:5939-5942 (1986)), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки, и сообщалось о полной свиной последовательности кДНК, полученной при помощи ПЦР-амплификации последовательностей фактора VIII из библиотеки кДНК свиной селезенки (Healey J. F. et al., Blood 55:4209-4214 (1996), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки). Гибридный человеческий/свиной фактор VIII, содержащий замещения всех доменов, всех субъединиц и определенных аминокислотных последовательностей, был раскрыт в патенте США №5364771 авторства Lollar and Runge и в WO 93/20093, в полном объеме включенных в данный документ посредством ссылки. Недавно в WO 94/11503, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки, сообщалось о нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностях доменов A1 и A2 свиного фактора VIII и химерного фактора VIII, в котором свиные домены A1 и/или A2 замещены соответствующими человеческими доменами. В патенте США №5859204 авторства Lollar J.S. Также раскрыта свиная кДНК и полученные по ней аминокислотные последовательности. В патенте США №6458563, в полном объеме включенном в данный документ посредством ссылки и приписанном Emody, раскрыт свиной фактор VIII с удаленным В-доменом.

В контексте данного документа "В-домен" фактора VIII представляет собой известный в данной области техники В-домен, который определяется внутренней идентичностью аминокислотной последовательности и сайтами протеолитического расщепления тромбином, например остатками Ser741-Arg1648 полноразмерного зрелого человеческого фактора VIII. Другие домены человеческого фактора VIII определяются следующими аминокислотными остатками: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; A3, остатки Ser1690-Ile2032; C1, остатки Arg2033-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 содержит остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшуюся последовательность, остатки Glu1649-Arg1689, обычно называют активационным пептидом легкой цепи фактора VIII. Местонахож-

дение границ всех доменов, включая В-домены, для свиного, мышиногo и собачьего фактора VIII, также известно в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения В-домен фактора VIII удален ("фактор VIII с удаленным В-доменом" или "BDD FVIII"). Примером BDD FVIII является RE-FACTO® (рекомбинантный BDD FVIII), который имеет последовательность, такую же как часть последовательности фактора VIII в табл. 11A(i) (аминокислоты от 1 до 1457 или от 20 до 1457 из SEQ ID NO:2). В другом варианте реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом содержит интактный участок внутриклеточного процессинга, который соответствует аргинину в остатке 754 фактора VIII с удаленным В-доменом, который соответствует остатку аргинина 773 из SEQ ID NO: 2, или в остатке 1648 полноразмерного фактора VIII, который соответствует остатку аргинина 1667 из SEQ ID NO: 6. Номера остатков в последовательностях, употребляемые в данном документе без отсылки к каким-либо номерам SEQ ID, соответствуют последовательности фактора VIII без последовательности сигнального пептида (19 аминокислот) если не указано иное. Например, S743/Q1638 полноразмерного фактора VIII соответствует S762/Q1657 из SEQ ID NO: 6 из-за 19-аминокислотной последовательности сигнального пептида. В других вариантах реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом содержит замещение или мутацию в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1645, замещение или мутацию в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1648, или замещение или мутацию в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1645 и аргинину 1648 в полноразмерном факторе VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения замещающая аминокислота в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1645, представляет собой аминокислоту, отличную от замещающей аминокислоты в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1648. В определенных вариантах реализации изобретения замещение или мутация представляю собой аминокислоту, отличную от аргинина, например, аланин.

"Фактор VIII с удаленным В-доменом" может содержать полные или частичные удаления, раскрытые в патентах США №№ 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563, каждый из которых в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность фактора VIII с удаленным В-доменом согласно настоящему изобретению содержит любое из удалений, раскрытых в кол. 4, строка 4 - кол. 5, строка 28 и примерах 1-5 патента США № 6316226 (также в US 6346513). В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом согласно настоящему изобретению содержит удаление, раскрытое в кол. 2, строки 26-51 и примерах 5-8 патента США № 5789203 (также US 6060447, US 5595886 и US 6228620). В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом содержит удаление, описанное в кол. 1, строки 25 - кол. 2, строка 40 патента США № 5972885; кол. 6, строки 1-22 и примере 1 патента США № 6048720; кол. 2, строки 17-46 патента США № 5543502; кол. 4, строка 22 - кол. 5, строка 36 патента США № 5171844; кол. 2, строки 55-68, на фиг. 2 и в примере 1 патента США № 5112950; кол. 2, строка 2 - кол. 19, строка 21 и табл. 2 патента США № 4868112; кол. 2, строка 1 - кол. 3, строка 19, кол. 3, строка 40 - кол. 4, строка 67, кол. 7, строка 43 - кол. 8, строка 26 и кол. 11, строка 5 - кол. 13, строка 39 патента США № 7041635; или кол. 4, строки 25-53 патента США № 6458563. В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом содержит удаление большей части В-домена, но при этом содержит аминокислотные последовательности В-домена, которые важны для *in vivo* протеолитического процессинга первичного продукта трансляции в две полипептидные цепи (т.е. участок внутриклеточного процессинга), как описано в WO 91/09122, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом сконструирован с удалением аминокислот 747-1638, т.е. практически полным удалением В-домена. Hoesen R.C. et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки. Фактор VIII с удаленным В-доменом может также содержать удаление аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 фактора VIII. Meulien P. et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки. Дополнительные удаления в В-доме, которые являются частью изобретения, включают, например: удаление аминокислот от 982 до 1562 или от 760 до 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:5939-5942 (1986)), от 797 до 1562 (Eaton et al., Biochemistry 25:8343-8347 (1986)), от 741 до 1646 (Kaufman (заявка согласно PCT № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver et al., DNA 6:553-564 (1987)), от 741 до 1648 (Pasek (заявка согласно PCT № 88/00831)), от 816 до 1598 или от 741 до 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)), которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом содержит частичное удаление В-домена, т.е., 21 аминокислоты из В-домена (т.е. SFSQNSRHPSQNPPVLKRHRQ, которая представляет собой SEQ ID NO: 17), что раскрыто в публикации США № 20100286067 и публикации США № US 20120093840, которые обе в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Каждое из вышеописанных удалений можно осуществлять в любой последовательности фактора VIII.

В одном варианте реализации изобретения часть фактора VIII с удаленным В-доменом в полипептиде FVIII расщеплена на две цепи, соединенные (или ассоциированные) посредством металлической

связи, при этом первая цепь содержит тяжелую цепь (A1-A1-частичный B), а вторая цепь содержит легкую цепь (A3-C1-C2). В другом варианте реализации изобретения часть фактора VIII с удаленным B-доменом представляет собой одноцепочечный фактор VIII. Одноцепочечный фактор VIII может содержать участок внутриклеточного процессинга, который соответствует аргинину в остатке 754 фактора VIII с удаленным B-доменом (остаток 773 из SEQ ID NO: 2) или в остатке 1648 полноразмерного фактора VIII (остаток 1657 из SEQ ID NO: 6).

Металлическая связь между тяжелой цепью и легкой цепью может быть любой известной в данной области техники металлической связью. Например, металлы, применимые в рамках изобретения, могут представлять собой дивалентный ион металла. Металлы, которые можно применять для ассоциации тяжелой цепи и легкой цепи, включают, но не ограничиваются этим,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$ . Fatouros et al., Intern. J. Pharm. 155(1): 121-131 (1997); Wakabayashi et al., JBC. 279(13): 12677-12684 (2004).

Применяемый в данном документе полипептид FVIII может содержать процессированный фактор VIII или одноцепочечный фактор VIII или их комбинацию. В контексте данного документа "процессированный фактор VIII" означает фактор VIII, который был расщеплен в аргинине 1648 (в случае полноразмерного фактора VIII) или аргинине 754 (в случае фактора VIII с удаленным B-доменом); т.е. на участке внутриклеточного процессинга. Вследствие расщепления на участке внутриклеточного процессинга процессированный фактор VIII содержит две полипептидные цепи, первая из которых представляет собой тяжелую цепь, а вторая представляет собой легкую цепь. Например, слитый белок процессированный фактор VIII-Fc (т.е. тяжелая цепь и легкая цепь, слитые с Fc), соответствующий приблизительно 90 и 130 кДа в невосстанавливающем ДСН-ПААГ, соответственно, и 90 и 105 кДа в восстанавливающем ДСН-ПААГ соответственно. Следовательно, в одном варианте реализации изобретения по меньшей мере около 50%, около 60%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% части фактора VIII в полипептиде длительного действия или в полипептиде FVIII короткого действия представляет собой процессированный фактор VIII. В другом варианте реализации изобретения около 50%, около 60%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% части фактора VIII в полипептиде длительного действия или в полипептиде FVIII короткого действия представляет собой процессированный фактор VIII. В конкретном варианте реализации изобретения полипептид FVIII, содержащий процессированный фактор VIII, очищен (или выделен) из полипептида, содержащего одноцепочечный фактор VIII, а по меньшей мере около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% части фактора VIII в полипептиде длительного действия или в полипептиде FVIII короткого действия представляет собой процессированный фактор VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FVIII содержит от около 15% до 25% одноцепочечного полипептида FVIII и от около 75% до около 85% процессированного полипептида FVIII.

В контексте данного документа "одноцепочечный фактор VIII", "SC фактор VIII" или "SCFVIII" означает фактор VIII, который не был расщеплен в участке аргинина (остаток 1648 в случае полноразмерного фактора VIII (т.е. остаток 1667 из SEQ ID NO: 6) или остаток 754 в случае фактора VIII с удаленным B-доменом (т.е. остаток 773 из SEQ ID NO: 2)). Следовательно, применяемый в данном документе одноцепочечный фактор VIII в полипептиде FVIII содержит одну цепь. В одном варианте реализации изобретения одноцепочечный фактор VIII содержит интактный участок внутриклеточного процессинга. В другом варианте реализации изобретения одноцепочечный фактор VIII согласно изобретению содержит замещение или мутацию в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1645, замещение или мутацию в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1648 или замещение или мутацию в аминокислотных позициях, соответствующих аргинину 1645 и аргинину 1648 в полноразмерном факторе VIII. В других вариантах реализации изобретения замещающая аминокислота в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1645, отличается от замещающей аминокислоты в аминокислотной позиции, соответствующей аргинину 1648. В определенных вариантах реализации изобретения замещение или мутация представляет собой аминокислоту, отличную 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. Слитый белок одноцепочечный фактор VIII-Fc может соответствовать приблизительно 220 кДа в невосстанавливающем ДСН-ПААГ и приблизительно 195 кДа в восстанавливающем ДСН-ПААГ.

Применяемая в данном документе часть фактора VIII в полипептиде FVIII обладает активностью фактора VIII. Активность фактора VIII можно определить любыми известными в данной области техники методами. Например, одним из таких методов может быть хромогенный анализ. Механизм хромогенного анализа основан на принципах системы свертывания крови, в которой активированный фактор VIII ускоряет преобразование фактора X в фактор Ха в присутствии активированного фактора IX, фосфолипидов и ионов кальция. Активность фактора Ха оценивают при помощи гидролиза субстрата п-нитроанилида (pNA), специфического в отношении фактора Ха. Начальная скорость высвобождения п-нитроанилина, измеренная при 405 нМ, прямо пропорциональна активности фактора Ха и, следовательно,



но, активности фактора VIII в образце. Хромогенный анализ рекомендован Подкомитетом по фактору VIII и фактору IX Комитета по науке и стандартизации (SSC) Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH). Начиная с 1994 г., хромогенный анализ также является эталонным методом Европейской фармакопеи для определения эффективности концентрата FVIII. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения полипептид FVIII, содержащий одноцепочечный фактор VIII, обладает активностью фактора VIII, сопоставимой с полипептидом FVIII, содержащим процессированный фактор VIII, при этом активность фактора VIII измеряется *in vitro* методом хромогенного анализа.

В определенном варианте реализации изобретения полипептид FVIII длительного действия представляет собой мономерно-димерный гибрид FVIII. Для получения мономерно-димерного гибрида FVIII из человеческой поли-А РНК (Clontech) получали кодирующую последовательность человеческого рекомбинантного FVIII с удаленным В-доменом при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя FVIII-специфические праймеры. Последовательность FVIII содержит нативную сигнальную последовательность для FVIII. Удаление В-домена имело место от серина 743 (S743; 2287 п.о.) до глутамина 1638 (Q1638; 4969 п.о.), а полное удаление составило 2682 п.о. Затем кодирующую последовательность человеческой рекомбинантной Fc получали при помощи ОТ-ПЦР из библиотеки к ДНК человеческих лейкоцитов (Clontech), используя Fc-специфические праймеры. Праймеры конструировали таким образом, чтобы последовательность FVIII с удаленным В-доменом была непосредственно слита с N-концом последовательности Fc без промежуточного линкера. Последовательность ДНК FVIII<sub>Fc</sub> клонировали в вектор двойной экспрессии млекопитающих pBUDCE4.1 (Invitrogen) под управлением CMB промотора. Вторую идентичную последовательность Fc, включая мышиную сигнальную последовательность Igk, получали при помощи ОТ-ПЦР и клонировали ниже второго промотора, EF1 $\alpha$ , в экспрессионный вектор pBUDCE4.1.

В одном варианте реализации изобретения партнер по связыванию FcRn может представлять собой Fc-область. Партнер по связыванию FcRn представляет собой любую молекулу, которая может специфически связываться рецептором FcRn с последующим активным транспортом рецептором FcRn партнера по связыванию FcRn. Таким образом, термин Fc включает любые варианты IgG Fc, которые являются функциональными. Область Fc-части IgG, которая связывается с рецептором FcRn, была описана на основании рентгеноструктурной кристаллографии (Burmeister et al., Nature 372:379 (1994), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки). Основная область контакта Fc с FcRn находится вблизи соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn находятся в пределах одной тяжелой цепи Ig. Партнеры по связыванию FcRn включают, например, целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые содержат полную связывающую область FcRn. Основные участки контакта 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. Ссылки на нумерацию аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулинов, или их областей основаны на Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки. (Рецептор FcRn был выделен из нескольких видов млекопитающих, включая людей. Известны последовательности человеческого FcRn, крысиного FcRn и мышинного FcRn (Story et al., J. Exp. Med. 180: 2377 (1994), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки). Fc может содержать домены CH2 и CH3 иммуноглобулина с или без шарнирной области иммуноглобулина. Типовые Fc-варианты предложены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, в полном объеме включенных в данный документ посредством ссылки.

Fc (или Fc-часть химерного полипептида) может содержать одну или более мутаций или комбинаций мутаций.

Fc (или Fc-часть химерного полипептида) может содержать мутации, приводящие к увеличению периода полувыведения, такие как M252Y, S254T, T256E и их комбинации, как раскрыто в Oganesyan et al., Mol. Immunol. 46:1750 (2009), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки; H433K, N434F и их комбинации, как раскрыто в Vaccaro et al., Nat. Biotechnol. 23:1283 (2005), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки; мутанты, раскрытые на страницах 1-2, параграф [0012], и примерах 9 и 10 в US 2009/0264627 A1, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки; и мутанты, раскрытые на странице 2, параграфы от [0014] до [0021] в US 20090163699 A1, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Fc (или Fc-часть химерного полипептида) также может содержать, например, следующие мутации: Fc-область IgG может быть модифицирована в соответствии с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и ему подобные, чтобы получить модифицированные фрагменты IgG или Fc или их части, которые будут связываться FcRn. Такие модификации включают, например, как модификации, удаленные от контактных участков FcRn, так и модификации в пределах контактных участков, которые сохраняют и даже повышают связывание с FcRn. Например, следующие единичные аминокислотные остатки в человеческом IgG1 Fc (Fc $\gamma$ 1) можно замещать практически без 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, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где, например, P238A представляет пролин дикого типа, замещенный аланином в позиции номер 238. Кроме аланина, другие аминокислоты могут замещать аминокислоты дикого типа в указанных выше позициях. Мутации можно вводить в Fc по одной, чтобы получить более одной сотни партнеров по связыванию FcRn, отличных от нативной Fc. Кроме того, можно вместе вводить комбинации из двух, трех или более таких отдельных мутаций, чтобы получить еще сотни партнеров по связыванию FcRn. Определенные такие мутации могут обеспечивать дополнительную функциональность партнера по связыванию FcRn. Например, в один вариант реализации изобретения включена N297A, приводящая к удалению высококонсервативного участка N-гликозилирования. Действие этой мутации состоит в снижении иммуногенности, что тем самым увеличивает период полувыведения из циркуляции партнера по связыванию FcRn, и в получении партнера по связыванию FcRn, неспособного связываться с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIIA, но при этом сохраняющего аффинность в отношении FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Кроме того, оказалось, что по меньшей мере три человеческих Fc гамма-рецептора распознают участок связывания IgG в пределах нижней шарнирной области, в общем случае, аминокислот 234-237. Следовательно, другой пример новой функциональности и потенциального снижения иммуногенности может являться следствием мутаций в этой области, например, замещения аминокислот 233-236 человеческого IgG1 "ELLG" соответствующей последовательностью из IgG2 "PVA" (с одной аминокислотной делецией). Было показано, что FcγRI, FcγRII и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не связываются с IgG1 в случае введения таких мутаций (Ward and Ghete, Therapeutic Immunology 2:77 (1995), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки; и Armour et al., Eur. J. Immunol. 29:2613 (1999), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). В качестве дополнительного примера новой функциональности, являющейся следствием описанных выше мутаций, можно привести возможность в некоторых случаях повышения аффинности в отношении FcRn относительно дикого типа. Эта повышенная аффинность может отображаться на повышенной скорости ассоциации, пониженной скорости диссоциации или как повышенной скорости ассоциации, так и пониженной скорости диссоциации. Мутации, которые, как считается, оказывают влияние на повышение аффинности в отношении FcRn, включают, например, T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591 (2001), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки).

Fc (или Fc-часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 11 (аминокислоты от 1458 до 1684 из SEQ ID NO:2 или аминокислоты от 2352 до 2578 из SEQ ID NO:6). Fc (или Fc-часть химерного полипептида) может быть идентичной аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 11 (аминокислоты от 1458 до 1684 из SEQ ID NO:2 и аминокислоты от 2352 до 2578 из SEQ ID NO:6).

Является ли любая конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной нуклеотидной последовательности или полипептиду согласно настоящему изобретению, можно определить на практике, традиционно используя известные компьютерные программы. В одном варианте реализации изобретения способ определения наибольшего общего сходства между запрашиваемой последовательностью (стандартной или оригинальной последовательностью) и исследуемой последовательностью, называемый также глобальным выравниванием последовательностей, может использовать компьютерную программу FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В выравнивании последовательностей запрашиваемая и исследуемая последовательности обе представляют собой последовательности ДНК. Последовательности РНК можно сравнивать после замены U на T. Результатом указанного глобального выравнивания последовательностей является определение процента идентичности. В другом варианте реализации изобретения в FASTDB выравнивании последовательностей ДНК для расчета процента идентичности используют следующие параметры: матрица - унитарная, k-кортеж - 4, штраф за нарушение комплементарности - 1, штраф за соединение - 30, длина группы рандомизации - 0, граничный вес - 1, штраф за гэп - 5, штраф за размер гэпа 0,05, размер окна - 500 или длина исследуемой нуклеотидной последовательности, в зависимости от того, что короче.

Если исследуемая последовательность короче запрашиваемой последовательности вследствие 5' или 3' делеций, но не из-за внутренних делеций, результаты необходимо скорректировать вручную. Это связано с тем, что программа FASTDB не учитывает 5' и 3' усеечения исследуемой последовательности

при расчете процента идентичности. В случае исследуемых последовательностей, усеченных в 5' или 3' концах по сравнению с запрашиваемой последовательностью, процент идентичности корректируют, подсчитывая количество оснований запрашиваемой последовательности, которые находятся в 5' и 3' концах исследуемой последовательности, и которые не совпадают/выровнены, как процент от общего количества оснований запрашиваемой последовательности. Является ли нуклеотид совпадающим/выровненным, определяется по результатам выравнивания последовательностей FASTDB. Затем это процентное содержание вычитается из процента идентичности, рассчитанного при помощи вышеуказанной программы FASTDB с использованием заданных параметров, чтобы получить конечную оценку процента идентичности. Эту скорректированную оценку применяют в целях настоящего изобретения. Только основания за пределами 5' и 3' оснований исследуемой последовательности согласно данным выравнивания FASTDB, которые не совпадают/выровнены с запрашиваемой последовательностью, учитываются при расчете в целях ручной корректировки процента идентичности.

Например, для определения процента идентичности проводят выравнивание исследуемой последовательности в 90 оснований с запрашиваемой последовательностью в 100 оснований. Делеций находятся в 5' конце исследуемой последовательности и, следовательно, выравнивание FASTDB не показывает спаривания/выравнивания первых 10 оснований в 5' конце. 10 неспаренных оснований представляют 10% последовательности (количество оснований в 5' и 3' концах не совпадает с общим количеством оснований в запрашиваемой последовательности), следовательно, из процента идентичности, рассчитанного при помощи программы FASTDB, вычитают 10%. Если оставшиеся 90 оснований совпадают идеально, конечный процент идентичности составит 90%. В другом примере проводят сравнение исследуемой последовательности в 90 оснований с запрашиваемой последовательностью в 100 оснований. На этот раз делеций являются внутренними, поэтому в 5' или 3' концах исследуемой последовательности нет оснований, которые не совпадают/выровнены с запросом. В этом случае процент идентичности, рассчитанный при помощи программы FASTDB, не корректируют вручную. Повторяясь, только основания в 5' и 3' концах исследуемой последовательности, которые не совпадают/выровнены с запрашиваемой последовательностью, учитываются при ручной коррекции. Других ручных коррекций в целях настоящего изобретения не проводят.

Под полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" запрашиваемой аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению, подразумевают то, что аминокислотная последовательность исследуемого полипептида идентична запрашиваемой последовательности за исключением того, что исследуемая полипептидная последовательность может содержать до пяти аминокислотных отличий на каждые 100 аминокислот запрашиваемой аминокислотной последовательности. Другими словами, чтобы получить полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% "идентичную" запрашиваемой аминокислотной последовательности, в исследуемой последовательности могут быть вставлены, удалены (инсерции-делеции) или замещены другими аминокислотами до 5% аминокислотных остатков. Эти отличия от стандартной последовательности могут находиться в амино- или карбокситерминальных позициях стандартной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими терминальными позициями, по одному вперемежку с остатками в стандартной последовательности или в одной или нескольких сопряженных группах в пределах стандартной последовательности.

Является ли любой конкретный полипептид по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным, например, аминокислотным последовательностям SEQ ID NO:2 (части фактора VIII, Fc-части, по отдельности или вместе) или 4, или известной полипептидной последовательности фактора VIII или Fc, можно определить на практике, традиционно используя известные компьютерные программы. В одном варианте реализации изобретения способ определения наибольшего общего сходства между запрашиваемой последовательностью (стандартной или оригинальной последовательностью) и исследуемой последовательностью, называемый также глобальным выравниванием последовательностей, может использовать компьютерную программу FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В выравнивании последовательностей запрашиваемая и исследуемая последовательности обе представляют собой нуклеотидные последовательности или обе представляют собой аминокислотные последовательности. Результатом указанного глобального выравнивания последовательностей является определение процента идентичности. В другом варианте реализации изобретения в аминокислотном выравнивании FASTDB для расчета процента идентичности используют следующие параметры: матрица - PAM 0, k-кортеж - 2, штраф за несовпадение - 1, штраф за соединение - 20, длина группы рандомизации - 0, граничный вес - 1, размер окна - длина последовательности, штраф за гэп - 5, штраф за размер гэпа 0,05, размер окна - 500 или длина исследуемой аминокислотной последовательности, в зависимости от того, что короче.

Если исследуемая последовательность короче запрашиваемой последовательности вследствие N- или C-терминальных делеций, но не из-за внутренних делеций, результаты необходимо скорректировать вручную. Это связано с тем, что программа FASTDB не учитывает N- или C-терминальные усечения исследуемой последовательности при расчете глобального процента идентичности. В случае исследуемых

последовательностей, усеченных в N- или С-концах по сравнению с запрашиваемой последовательностью, процент идентичности корректируют, подсчитывая количество остатков запрашиваемой последовательности, которые находятся в N- или С-концах исследуемой последовательности, и которые не совпадают/выровнены с соответствующим исследуемым остатком, как процент от общего количества остатков запрашиваемой последовательности. Является ли остаток совпадающим/выровненным, определяется по результатам выравнивания последовательностей FASTDB. Затем это процентное содержание вычитается из процента идентичности, рассчитанного при помощи вышеуказанной программы FASTDB с использованием заданных параметров, чтобы получить конечную оценку процента идентичности. Эту конечную оценку процента идентичности применяют в целях настоящего изобретения. Только остатки в N- или С-концах исследуемой последовательности, которые не совпадают/выровнены с запрашиваемой последовательностью, учитываются при расчете в целях ручной корректировки процента идентичности. Это означает, что учитываются только позиции запрашиваемых остатков за пределами самых крайних N- или С-терминальных остатков исследуемой последовательности.

Например, для определения процента идентичности проводят выравнивание исследуемой последовательности в 90 аминокислотных остатков с запрашиваемой последовательностью в 100 остатков. Делеции находятся в N-конце исследуемой последовательности и, следовательно, выравнивание FASTDB не показывает совпадения/выравнивания первых 10 остатков в N-конце. 10 неспаренных остатков представляют 10% последовательности (количество остатков в N- и С-концах не совпадает с общим количеством остатков в запрашиваемой последовательности), следовательно, из процента идентичности, рассчитанного при помощи программы FASTDB, вычитают 10%. Если оставшиеся 90 остатков совпадают идеально, конечный процент идентичности составит 90%. В другом примере проводят сравнение исследуемой последовательности в 90 остатков с запрашиваемой последовательностью в 100 остатков. На этот раз делеции являются внутренними, поэтому в N- или С-концах исследуемой последовательности нет остатков, которые не совпадают/выровнены с запросом. В этом случае процент идентичности, рассчитанный при помощи программы FASTDB, не корректируют вручную. Повторяясь, только остатки за пределами N- и С-терминальных окончаний исследуемой последовательности согласно данным выравнивания FASTDB, которые не совпадают/выровнены с запрашиваемой последовательностью, учитываются при ручной коррекции. Других ручных коррекций в целях настоящего изобретения не проводят.

Полинуклеотидные варианты могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или как в одних, так и в других. В одном варианте реализации изобретения полинуклеотидные варианты содержат изменения, результатом которых являются молчащие замены, добавки или делеции, но которые не изменяют свойства или активность кодируемого полипептида. В другом варианте реализации изобретения нуклеотидные варианты получены при помощи молчащих замен вследствие вырожденности генетического кода. В других вариантах реализации изобретения описаны варианты, в которых в любой комбинации заменены, удалены или добавлены 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты. Существуют разные причины для получения полинуклеотидных вариантов, например, для оптимизации экспрессии кодонов в случае конкретного хозяина (замены кодонов в человеческой мРНК на другие, например бактериальные, такие как *E.coli*).

Варианты природного происхождения называются "аллельными вариантами" и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего заданный локус в хромосоме организма (Genes II, Lewin B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут различаться на полинуклеотидном и/или полипептидном уровне и включены в настоящее изобретение. В альтернативном варианте варианты неприродного происхождения могут быть получены методами мутагенеза или прямым синтезом.

Используя известные методы белкового конструирования и технологии рекомбинантных ДНК, можно создавать варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, можно удалять одну или более аминокислот на N-конце или С-конце секретируемого белка практически без потери биологической функции. В Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки, сообщается о вариантных KGF-белках, обладающих гепарин-связывающей активностью даже после удаления 3, 8 или 27 аминокислотных остатков. Аналогично, интерферон гамма демонстрировал до десяти раз большую активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков на карбокси-конце этого белка. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки).

Кроме того, многочисленные данные демонстрируют, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с активностью белка природного происхождения. Например, Gayle и его соавторы (J. Biol. Chem 268:22105-22111 (1993), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки) провели расширенный мутационный анализ человеческого цитокина IL-1a. Они использовали случайный мутагенез для получения более 3500 отдельных мутантов IL-1a, которые в среднем содержали 2,5 аминокислотных изменений на вариант на протяжении всей длины молекулы. Многочисленные мутации исследовали в любой возможной аминокислотной позиции. Авторы изобретения обнаружили, что "[большинство молекул можно изменить с минимальным влиянием как на связывающую, так и на биологическую активность]". (См. реферат). В действительности, только 23 уникальные

аминокислотные последовательности, полученные из более чем 3500 исследуемых нуклеотидных последовательностей, приводили к получению белка, активность которого существенно отличалась от дикого типа.

Как указано выше, полипептидные варианты включают, например, модифицированные полипептиды. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемм-компонента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное связывание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристилирование, окисление, пэгилирование (Mei et al., Blood 116:270-79 (2010), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатацию, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот в белки, такое как аргинилирование и убиквитинирование. В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII является модифицированным, например пэгилированным, в любом удобном месте. В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII является пэгилированным в поверхностных аминокислотах фактора VIII, например поверхностном цистеине, который может быть сконструированным цистеином. Id. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированный фактор VIII, например пэгилированный фактор VIII, представляет собой фактор VIII длительного действия.

### III. Способ введения.

Лечение гемофилии А представляет собой заместительную терапию, нацеленную на восстановление активности FVIII от 1 до 5% от нормальных уровней для предотвращения спонтанных кровотечений (Mannucci P.M. et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001), в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки). Настоящее изобретение также включает способы введения фармацевтической композиции согласно изобретению. В настоящем изобретении предложен способ введения фармацевтической композиции нуждающемуся в этом субъекту-человеку (например, пациенту-человеку), включающий введение субъекту терапевтической дозы фармацевтической композиции, содержащей полипептид фактора VIII, например полипептид фактора VIII длительного действия или полипептид фактора VIII короткого действия, например полипептид фактор VIII-Fc или гибрид такого полипептида, с определенным интервалом дозирования.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию согласно изобретению применяют для снижения или уменьшения появления одного или более эпизодов кровотечений или их частоты (например, возникновения состояния кровотечения) у нуждающегося в этом субъекта. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию согласно изобретению применяют для лечения или предотвращения состояния кровотечения у нуждающегося в этом субъекта. Причиной состояния кровотечения может быть нарушение свертываемости крови. Нарушение свертываемости крови также может называться коагулопатией. В одном примере нарушением свертываемости крови, которое можно лечить при помощи фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, является гемофилия. В другом примере нарушением свертываемости крови, которое можно лечить при помощи фармацевтической композиции согласно изобретению, является гемофилия А.

В некоторых вариантах реализации изобретения тип кровотечения, связанного с состоянием кровотечения, выбран из гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровотечения, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве или кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы.

В других вариантах реализации изобретения субъект, страдающий от состояния кровотечения, нуждается в лечении для проведения хирургического вмешательства, включая, например, хирургическую профилактику или периоперационное ведение. В одном примере хирургическое вмешательство выбрано из малого хирургического вмешательства и обширного хирургического вмешательства. Типовые хирургические процедуры включают удаление зубов, тонзилэктомию, паховое грыжесечение, синовэктомию, трепанацию черепа, остеосинтез, травматическую хирургию, внутричерепную хирургию, внутрибрюшную хирургию, внутригрудную хирургию, хирургию по замещению суставов (например, полное замещение коленного сустава, замещение тазобедренного сустава и тому подобное), хирургию сердца и кесарево сечение.

В настоящем изобретении также предложен способ снижения или уменьшения годового показателя частоты кровотечений (ГПЧК) у субъекта с гемофилией, включающий введение субъекту эффективной дозы полипептида FVIII. В одном варианте реализации изобретения полипептид FVIII длительного действия вводят с интервалом дозирования каждые три дня или более. В другом варианте реализации изобретения

бретения эффективная доза составляет между около 20 МЕ/кг и около 90 МЕ/кг. В других вариантах реализации изобретения эффективная доза составляет 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 или 80-90 МЕ/кг. В других вариантах реализации изобретения эффективная доза составляет 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 МЕ/кг.

В определенных вариантах реализации изобретения введение полипептида FVIII предназначено для индивидуализированной (адаптированной) профилактики и приводит к ГПЧК, составляющему менее чем около 5,5, менее чем около 5,4, менее чем около 5,3, менее чем около 5,2, менее чем около 5,1, менее чем около 5,0, менее чем около 4,9, менее чем около 4,8, менее чем около 4,7, менее чем около 4,6 или менее чем около 4,5.

В других вариантах реализации изобретения введение приводит к ГПЧК, составляющему от около 4,7 до 0. В некоторых вариантах реализации изобретения медианное значение ГПЧК составляет около 1,6. В других вариантах реализации изобретения среднее значение ГПЧК составляет около 2,9. В одном аспекте индивидуализированной профилактической схемы эффективная доза составляет от около 25 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг и вводится каждые три-пять дней. Например, эффективная доза составляет от около 25 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг и вводится каждые три дня. В другом аспекте эффективная доза составляет от около 50 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые четыре дня или каждые пять дней. В других аспектах эффективная доза составляет до 65 МЕ/кг каждые три дня. В других вариантах реализации изобретения эффективная доза полипептида FVIII модифицирована на основании фармакокинетического профиля пациента. В одном примере пациенту сначала вводят две дозы - первую дозу в 25 МЕ/кг на 1 день и вторую дозу в 50 МЕ/кг на 4 день. Если фармакокинетические данные показывают менее чем 1% остаточный уровень от нормальной активности FVIII после двух начальных доз, пациенту после этого вводят от около 25 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые три дня. В другом примере, если фармакокинетические данные показывают более чем 1% остаточный уровень от нормальной активности FVIII на протяжении пяти дней после дозирования, пациенту после этого вводят от около 50 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые пять дней. Если у пациента наблюдается более двух спонтанных кровотечений на протяжении восьминедельного периода после введения от около 50 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые пять дней, пациенту вводят препарат согласно одной из следующих схем: (1) до около 65 МЕ/кг каждые три дня (для достижения целевого остаточного уровня, составляющего до 5% от нормы), (2) от около 50 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые четыре дня (для достижения целевого остаточного уровня, составляющего до 5% от нормы) или (3) от около 25 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые три дня (для достижения целевого остаточного уровня, составляющего от 1 до 3% от нормы). Если у пациента, получающего от около 50 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые четыре дня, все еще наблюдается более двух спонтанных кровотечений, максимальную дозу можно повысить до около 65 МЕ/кг каждые три дня. В некоторых примерах интерквартильный диапазон (ИКД) ГПЧК для индивидуализированной профилактической схемы составляет от 0 до 4,7. В некоторых вариантах реализации изобретения введение полипептида FVIII предназначено для еженедельной профилактики и приводит к ГПЧК, составляющему менее, чем около 9,0, менее, чем около 8,9, менее, чем около 8,8, менее, чем около 8,7, менее, чем около 8,6, менее, чем около 8,5 или менее, чем около 8,4. В одном примере введение приводит к ГПЧК, составляющему между около 8,4 и 0. В другом примере медианное значение ГПЧК для еженедельной профилактики составляет около 3,6. В других примерах среднее значение ГПЧК для еженедельной профилактики составляет около 8,8. В других вариантах реализации изобретения эффективная доза для еженедельной профилактики составляет около 65 МЕ/кг один раз в неделю, например каждые пять дней, каждые шесть дней, каждые семь дней, каждые восемь дней или каждые девять дней. В некоторых примерах ИКД ГПЧК для еженедельной профилактической схемы составляет от 1,9 до 8,4.

В других вариантах реализации изобретения введение полипептида FVIII предназначено для эпизодического лечения или лечения по требованию и приводит к ГПЧК, составляющему менее чем около 55, менее чем около 54, менее чем около 53, менее чем около 52, менее чем около 51, менее чем около 50, менее чем около 49, менее чем около 48 или менее чем около 47. В одном примере введение приводит к ГПЧК, составляющему между около 49 и 0, например между 48,7 и 0. В другом примере медианное значение ГПЧК для эпизодического (по необходимости) лечения составляет около 33,5. В других примерах среднее значение ГПЧК для эпизодического (по необходимости) лечения составляет около 37,23. В других вариантах реализации изобретения эффективная доза для лечения по необходимости составляет от около 10 до 75 МЕ/кг каждые 12-24 ч. В некоторых примерах ИКД ГПЧК для лечения по необходимости составляет от 21,1 до 48,7.

В некоторых вариантах реализации изобретения эффективная доза для индивидуализированной профилактики, еженедельной профилактики или эпизодического лечения представляет собой фиксированную дозу или стратифицированную дозу. В одном аспекте фиксированная доза составляет около 2000 МЕ на дозу, около 2500 МЕ на дозу, около 3000 МЕ на дозу, около 3500 МЕ на дозу или около 4000 МЕ на дозу. Интервал дозирования для полипептида FVIII длительного действия может составлять по меньшей мере в от около полутора до шести раз больше, от полутора до пяти раз больше, от полутора до четырех раз больше, от полутора до трех раз больше или от полутора до двух раз больше, чем интервал дозирования, необходимый для эквивалентной дозы фактора VIII без не относящейся к фактору VIII час-

ти (полипептида, состоящего из части фактора VIII), например без Fc-части. Интервал дозирования может составлять по меньшей мере в от около полутора, двух, двух с половиной, трех, трех с половиной, четырех, четырех с половиной, пяти, пяти с половиной или шести раз больше, чем интервал дозирования, необходимый для эквивалентной дозы фактора VIII без не относящейся к фактору VIII части (полипептида, состоящего из части фактора VIII), например без Fc-части. Интервал дозирования может соответствовать каждым трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати или четырнадцать дням или более.

Способы согласно изобретению можно реализовывать на практике в отношении субъекта, нуждающегося в профилактическом лечении или лечении по необходимости. В случае лечения по необходимости интервал дозирования фармацевтической композицией, содержащей полипептид FVIII, соответствует одному разу каждые 24-36, 24-48, 24-72, 24-96, 24-120, 24-144, 24-168, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72 ч или более.

В одном варианте реализации изобретения субъект нуждается в лечении по необходимости (эпизодическом). В другом варианте реализации изобретения лечение по необходимости (эпизодическое) устраняет более 80% (более 80%, более 81%, более 82%, более 83%, более 84%, более 85%, более 86%, более 87%, более 88%, более 89%, более 90%, более 91%, более 92%, более 93%, более 94%, более 95%, более 96%, более 97%, более 98%, более 99 или 100%) или 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95% или 95-100% кровотечений (например, спонтанных кровотечений) после одной дозы. В другом варианте реализации изобретения более 80% (более 81%, более 82%, более 83%, более 84%, более 85%, более 86%, более 87%, более 88%, более 89%, более 90%, более 91%, более 92%, более 93%, более 94%, более 95%, более 96%, более 97%, более 98 или 100%) или 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95% или 95-100% эпизодов кровотечения имеют оценку "превосходно" или "хорошо" от врачей после лечения по необходимости (эпизодического). В других вариантах реализации изобретения более 5%, (более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14%, более 15%, более 16%, более 17%, более 18%, более 19%, более 20%) или 5-20%, 5-15%, 5-10%, 10-20% или 10-15% эпизодов кровотечения имеют оценку "удовлетворительно" от врачей после лечения по необходимости.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию, содержащую полипептид FVIII, применяют для профилактики. Профилактика может быть проиллюстрирована улучшением Смакс, улучшением Тмакс и/или увеличением среднего времени удержания по сравнению с FVIII короткого действия. В некоторых вариантах реализации изобретения профилактика приводит к отсутствию эпизодов спонтанного кровотечения на протяжении около 24, 36, 48, 72 или 96 ч (например, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96 часов) после инъекции (например, последней инъекции). В определенных вариантах реализации изобретения профилактика приводит к более чем 30% (например, более чем 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89 или 90%, например, более чем 50%) среднему снижению годового показателя частоты кровотечений при дозировании раз в неделю (например, 65 МЕ/кг).

В другом примере субъекта параллельно лечат при помощи FIX. Так как соединения согласно изобретению способны активировать FIXa, их можно применять для преактивации полипептида FIXa перед введением FIXa субъекту.

#### IV. Способ получения.

Полипептид FVIII можно получать в клетке-хозяине, содержащей вектор, кодирующий полипептид FVIII. В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин трансформирована одним или более векторами, содержащими первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FVIII и первый полипептид FcRn, вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид FcRn, и, необязательно, третью нуклеотидную последовательность, кодирующую протеинконвертазу, например, PC5. В контексте данного документа экспрессионный вектор относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае РНК вирусного вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции при внесении в соответствующую клетку-хозяина. Экспрессионные векторы могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные. В контексте данного документа последовательность, управляющая генной экспрессией, представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как последовательность промотора или комбинация промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Последовательность, управляющая генной экспрессией, может, например, представлять собой промотор млекопитающего или вируса, такой как конститутивный или индуцибельный промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, промоторы следующих генов: гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), аденозиндеаминазы, пируваткиназы, промотор бета-актина и другие конститутивные промоторы. Типовые вирус-

ные промоторы, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, включают, например, промоторы цитомегаловируса (ЦМВ), вируса обезьян (например, SV40), вируса папилломы, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (ДКП) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, а также промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы известны специалистам в данной области техники. Промоторы, которые можно применять в качестве последовательностей генной экспрессии согласно изобретению, также включают индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента. Например, промотор металлотионеина индуцируется для стимуляции транскрипции и трансляции в присутствии определенных ионов металлов. Другие индуцибельные промоторы известны специалистам в данной области техники.

Примеры векторов включают, но не ограничиваются этим, вирусные векторы или плазмидные векторы. Плазмидные векторы были широко описаны в данной области техники и хорошо известны специалистам в данной области техники. 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 исключительно удобны для доставки генов в клетки *in vivo* вследствие своей неспособности к репликации и интегрированию в геном хозяина. При этом плазмиды, содержащие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, который функционально кодируется плазмидой. Некоторые традиционно применяемые плазмиды, доступные из коммерческих источников, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные плазмиды pcDNA, pRC/CMV, различные плазмиды pCMV, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры специфических плазмид включают pcDNA3.1, номер в каталоге V79020; pcDNA3.1/hygro, номер в каталоге V87020; pcDNA4/mys-His, номер в каталоге V86320; и pBudCE4.1, номер в каталоге V53220, которые все поставляются Invitrogen (Carlsbad, CA.). Другие плазмиды хорошо известны специалистам в данной области техники. Кроме того, плазмиды можно сконструировать индивидуально при помощи стандартных методов молекулярной биологии, чтобы удалить и/или добавить специфические фрагменты ДНК.

Затем экспрессионные векторы или векторы трансфицируют или котрансфицируют в подходящую клетку-мишень, которая будет экспрессировать полипептиды. Методы трансфекции известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, преципитацию фосфатом кальция (Wigler et al. (1978) *Cell* 14:725), электропорацию (Neumann et al. (1982) *EMBO J.* 1:841) и применение реагентов на основе липосом. Для экспрессии описанных в данном документе белков можно применять большое количество систем хозяин-экспрессионный вектор, включая как прокариотические, так и эукариотические клетки. Они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*), трансформированные рекомбинантными экспрессионными векторами на основе ДНК бактериофага или плазмидной ДНК, содержащими подходящую кодирующую последовательность; дрожжи или мицелиальные грибы, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми или грибными экспрессионными векторами, содержащими подходящую кодирующую последовательность; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирус), содержащими подходящую кодирующую последовательность; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вируса мозаики цветной капусты или вируса табачной мозаики) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмиды), содержащими подходящую кодирующую последовательность; или системы клеток животных, включая клетки млекопитающих (например, клетки HEK293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 и BHK).

В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В контексте данного документа эукариотическая клетка относится к любой животной или растительной клетке, содержащей оформленное ядро. Эукариотические клетки животных включают клетки позвоночных, например млекопитающих, и клетки беспозвоночных, например насекомых. Эукариотические клетки растений, в частности, могут включать, без ограничений, дрожжевые клетки. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например бактерии. В определенных вариантах реализации изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Клетка млекопитающего представляет собой любую клетку, полученную от млекопитающего. Клетки млекопитающих, в частности, включают, но не ограничиваются этим, клеточные линии млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В другом варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK293, которая представляет человеческую эмбриональную клеточную линию почек. Клетки HEK293 доступны как CRL-1533 от Американской коллекции типовых культур, Manassas, VA, и как клетки 293-H, номер в каталоге 11631-017, или клетки 293-F, номер в каталоге 11625-019, от Invitrogen (Carlsbad, Calif.). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку PER.C6®, которая представляет человеческую клеточную линию, полученную из сетчатки. Клетки PER.C6® доступны от Crucell (Leiden, The Netherlands). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку яичников китайского хомяка (CHO). Клетки CHO доступны от Аме-

риканской коллекции типовых культур, Manassas, VA. (например, CHO-K1; CCL-61). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку почки новорожденного хомяка (BHK). Клетки BHK доступны от Американской коллекции типовых культур, Manassas, Va. (например, CRL-1632). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку НКВ11, которая представляет гибридную клеточную линию клеток НЕК293 и человеческий В-клеточной линии. Mei et al., Mol. Biotechnol. 34(2): 165-78 (2006).

Указанный способ может дополнительно включать этапы очистки. Различные виды этапов очистки хорошо известны в данной области техники.

### Примеры

#### Пример 1. Описание продукта.

rFVIII<sup>Fc</sup> представляет собой долгодействующий, полностью рекомбинантный белок слияния, состоящий из человеческого фактора свертывания крови VIII (FVIII), ковалентно связанного с Fc-доменом человеческого иммуноглобулина G1 (IgG1). Часть фактора VIII в rFVIII<sup>Fc</sup> имеет первичную аминокислотную последовательность и посттрансляционные модификации, которые сопоставимы с 90 + 80 кДа формой фактора VIII (т.е. с удалением В-домена). Fc-домен rFVIII<sup>Fc</sup> содержит шарнирную, CH2- и CH3-области IgG1. rFVIII<sup>Fc</sup> содержит 1882 аминокислоты с предполагаемой молекулярной массой, составляющей приблизительно 220 кДа.

rFVIII<sup>Fc</sup> получают при помощи технологии рекомбинантных ДНК в человеческой эмбриональной клеточной линии почек (НЕК), характеристики которой широко изучены. Клеточная линия экспрессирует rFVIII<sup>Fc</sup> в определенную среду для клеточного культивирования, которая не содержит белков, полученных из животных или человеческих источников. rFVIII<sup>Fc</sup> очищают при помощи ряда хроматографических этапов, что не требует применения моноклонального антитела. Процесс включает этап инактивации вирусов детергентом и множественные этапы элиминации вирусов, включая этап аффинной хроматографии и этап удержания вирусов при помощи 15 нм нанофильтрации. В процессах клеточного культивирования, очистки и получения препарата не используются добавки человеческого или животного происхождения. rFVIII<sup>Fc</sup> относится к фармакотерапевтической группе: кровоостанавливающие препараты, фактор свертывания крови VIII. Он предоставляется в виде стерильного, не содержащего консервантов, непирогенного, лиофилизированного порошка или таблетки от белого до грязно-белого цвета для внутривенного (ВВ) введения во флаконе для разового использования с прилагающимся жидким разбавителем в предварительно заполненной шприце. Кроме rFVIII<sup>Fc</sup> фармацевтическая композиция содержит в лиофилизате сахарозу, хлорид натрия, L-гистидин, хлорид кальция и полисорбат 20 или полисорбат 80 и содержит стерильную воду для инъекций. Каждый флакон для разового использования номинально содержит 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 или 6000 Международных единиц (МЕ) rFVIII<sup>Fc</sup>. После восстановления предоставленным разбавителем продукт содержит следующие вспомогательные вещества: сахарозу, хлорид натрия, L-гистидин, хлорид кальция и полисорбат 20 или полисорбат 80 в концентрациях, приведенных в табл. 1 или 2 ниже. Фармацевтическая композиция получена для внутривенного введения только после восстановления.

Каждая упаковка содержит флакон для порошка (стекло типа 1) с пробкой (бутил) и отмывающимся колпачком (алюминий), 3 мл растворителя в предварительно заполненном шприце (стекло типа 1) с поршнем (бутил), колпачком (бутилкаучук) и стерильным адаптером для флакона в качестве устройства для восстановления.

Таблица 1. Препараты rFVIII<sup>Fc</sup> после восстановления жидким разбавителем

rFVIII <sup>Fc</sup> МЕ/мл*	Сахароза % (м/об)	NaCl (мМ)	L-гистидин (мМ)	Хлорид кальция (мМ)	Полисорбат-20 % (м/об)
83 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
167 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
250 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
333 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
500 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
667 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
1000 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
1333 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
1667 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013
2000 МЕ/мл	1,33	205	6,64	5,4	0,013



Таблица 2. Препараты rFVIII<sub>C</sub> после восстановления жидким разбавителем

Компонент	Концентрация									
	250 МЕ/ флакон	500 МЕ/ флакон	750 МЕ/ флакон	1000 МЕ/ флакон	1500 МЕ/ флакон	2000 МЕ/ флакон	3000 МЕ/ флакон	4000 МЕ/ флакон	5000 МЕ/ флакон	6000 МЕ/ флакон
rFVIII <sub>C</sub> *	83 МЕ/мл	167 МЕ/мл	250 МЕ/мл	333 МЕ/мл	500 МЕ/мл	667 МЕ/мл	1000 МЕ/мл	1333 МЕ/мл	1667 МЕ/мл	2000 МЕ/мл
Сахароза	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл	13,3 мг/мл
Хлорид натрия	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл	12,0 мг/мл
L-гистидин	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл	1,03 мг/мл
Дигидрат хлорида кальция	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл	0,80 мг/мл
Полисорбат 20	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл	0,13 мг/мл
*Эффективность (МЕ) определяют при помощи хромогенного анализа Европейской фармакопеи против внутреннего стандарта, который относится к стандарту ВОЗ. Специфическая активность rFVIII <sub>C</sub> составляет 4000-10000 МЕ/мг белка.										

## Пример 2. Способ получения препарата.

Лекарственный продукт rFVIII<sub>C</sub> представляет собой стерильный лиофилизированный порошок для инъекций, предназначенный для внутривенного введения. К нему прилагается асептически заполненные флаконы для одноразового использования, которые номинально содержат 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 и 6000 МЕ на флакон. Флаконы представляют собой 10 мл USP/Ph. Eur. флаконы из стекла типа 1, запечатанные 20 мм покрытой тефлоном лиофилизационной пробкой из бутилкаучука и алюминиевым отламывающимся колпачком. До лиофилизации номинальный объем заполнения, предназначенный для 250-6000 МЕ флаконов, составляет 3 мл. Состав вспомогательных веществ в препарате до лиофилизации остается одним и тем же для всех дозировочных концентраций. Порошок для инъекций восстанавливают 3 мл разбавителя, содержащего стерильную воду для инъекций и поставляемого в стерильном предварительно заполненном шприце.

Составы растворов лекарственного продукта до лиофилизации представлены в табл. 3. Составы лекарственных продуктов после восстановления представлены в табл. 1 или 2 (пример 1).

Таблица 3. Концентрации компонентов препарата rFVIIIc до лиофилизации

Компонент	Концентрация									
	250 МЕ/ флакон	500 МЕ/ флакон	750 МЕ/ флакон	1000 МЕ/ флакон	1500 МЕ/ флакон	2000 МЕ/ флакон	3000 МЕ/ флакон	4000 МЕ/ флакон	5000 МЕ/ флакон	6000 МЕ/ флакон
rFVIIIc	150 МЕ/мл *	287,5 МЕ/мл*	431,25 МЕ/мл*	575 МЕ/мл*	862,5 МЕ/мл*	1150 МЕ/мл*	1725 МЕ/мл*	2300 МЕ/мл*	2875 МЕ/мл*	3450 МЕ/мл*
Сахароза	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл	20,0 мг/мл
Хлорид натрия	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл	18,0 мг/мл
L-гистидин	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл	1,55 мг/мл
Дигидрат хлорида кальция	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл	1,18 мг/мл
Полисорба т 20	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл
Вода для инъекций	Для получения 1 мл ***									
Объем заполнения	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
<p>* 20% излишек включен в случае концентрации 250 МЕ/флакон, чтобы гарантировать, что после изменений в процессе приготовления и исследования во флаконе присутствует по меньшей мере номинальная концентрация.</p> <p>** 15% излишек включен в случае концентраций 500-6000 МЕ/флакон, чтобы гарантировать, что после изменений в процессе приготовления и исследования во флаконе присутствует по меньшей мере номинальная концентрация.</p> <p>*** Удаляется при лиофилизации.</p>										

Пример 3. Дозировка и способ введения/Способ расчета начальной расчетной дозы.

rFVIIIc представляет собой антигемофилический фактор длительного действия (рекомбинантный), назначаемый взрослым и детям ( $\geq 12$  лет) с гемофилией А (врожденным дефицитом фактора FVIII), например, для контроля и предотвращения эпизодов кровотечения, стандартной профилактики для предотвращения или снижения частоты эпизодов кровотечения и периоперационного ведения (хирургической профилактики). Дозирование rFVIIIc может быть рассчитано так, как описано в данном примере, но также может быть определено при помощи стандартных тестов, таких как методы анализа активности FVIII, описанные в другом месте данного документа. Ожидается, что 1 МЕ rFVIIIc на кг массы тела увеличит уровень циркулирующего фактора VIII в 2 раза [МЕ/дл]. Было показано, что rFVIIIc имеет увеличенный период полувыведения из циркуляции.

Так как фармакокинетические (например, период полувыведения, in vivo восстановление) и клинические ответы пациентов на rFVIIIc могут варьироваться, ожидаемое in vivo пиковое увеличение уровня фактора VIII, выраженное в МЕ/дл (или в виде % от нормы), или необходимую дозу можно рассчитать при помощи следующих формул:

$$\text{МЕ/дл (или \% от нормы)} = [\text{общая доза (МЕ)} / \text{масса тела (кг)}] \times 2 \text{ (МЕ/дл на МЕ/кг)}$$

ИЛИ

$$\text{Доза (МЕ)} = \text{масса тела (кг)} \times \text{необходимое повышение фактора VIII (МЕ/дл или \% от нормы)} \times 0,5 \text{ (МЕ/кг на МЕ/дл)}$$

Следующую таблицу (табл. 4) можно применять в качестве руководства по дозированию в случае эпизодов кровотечения.

Таблица 4. Руководство по дозированию rFVIIIc для лечения кровотечений

Тяжесть кровотечения	Необходимый уровень фактора VIII (МЕ/дл или % от нормы)	Доза (МЕ/кг)/Частота дозирования (ч)
<b>Слабое и умеренное</b>  Например: суставы, поверхностные мышцы/без риска для нервно-сосудистой системы (за исключением подвздошно-поясничной мышцы), глубокие раны и почки, поверхностные мягкие ткани, слизистые оболочки	<b>40-60</b>	<b>20-30 МЕ/кг</b>  Повтор каждые 24-48 часов до устранения кровотечения
<b>Обширное</b>  Например: подвздошно-поясничные и глубокие мышцы с повреждением нервно-сосудистой системы или большой кровопотерей, забрюшинное пространство, ЦНС, горло и шея, желудочно-кишечный тракт.	<b>80-100</b>	<b>40-50 МЕ/кг</b>  Повтор каждые 12-24 часов до устранения кровотечения

По материалам WFH 2012.

Последующие дозировки и продолжительность лечения зависят от индивидуального клинического ответа, тяжести дефицита фактора VIII и места и степени кровотечения. Следующую таблицу (табл. 5) можно применять в качестве руководства по дозированию в случае периоперационного ведения (хирургической профилактики).

Таблица 5. Руководство по дозированию rFVIIIc для периоперационного ведения (хирургической профилактики)

Тип хирургического вмешательства	Целевой уровень фактора VIII (МЕ/дл или % от нормы)	Доза (МЕ/кг)/Частота дозирования (ч)
<b>Малое</b>  Малые операции, включая удаление зубов без осложнений	<b>50 -80</b>	<b>25-40 МЕ/кг</b>  Одной инфузии может быть достаточно. Повтор каждые 24 часа при необходимости для контроля кровотечения.
<b>Обширное</b>  Обширные операции, включая внутрибрюшные, хирургия по замещению суставов	<b>80 -120</b>	Начальная дооперационная доза в 40-60 МЕ/кг с последующей повторной дозой в 40-50 МЕ/кг через 8-24 часов и затем каждые 24 часа для поддержания активности FVIII в пределах целевого диапазона.  rFVIIIc имеет больший период полувыведения, чем продукты плазменного и рекомбинантного FVIII (См. Пример 5)

Для стандартной профилактики рекомендуемой схемой является 50 МЕ/кг каждые 3-5 дней. Доза может быть скорректирована на основании ответа пациента в диапазоне 25-65 МЕ/кг.

Для еженедельной профилактики рекомендуемая доза составляет 65 МЕ/кг. rFVIIIc противопоказан пациентам, у которых наблюдались тяжелые аллергические реакции, включая анафилаксию, на про-

дукт или его компоненты. В клинических исследованиях тяжелых аллергических реакций не наблюдали; однако, известно, что они возникали при применении других факторов для замещения фактора VIII. Клинический ответ на rFVIIIc может варьироваться. Если кровотечение не контролируется при помощи рекомендуемой дозы, можно определить плазменный уровень фактора VIII и вводить достаточную дозу rFVIIIc, чтобы достичь удовлетворительного клинического ответа. Если плазменный уровень фактора VIII у пациента не повышается, как ожидалось, или если кровотечение не контролируется после введения rFVIIIc, следует рассмотреть вариант присутствия ингибиторов (нейтрализующих антител) и провести соответствующие исследования. У пациентов, которые применяют rFVIIIc, можно отслеживать появление ингибиторов фактора VIII при помощи соответствующих клинических наблюдений и лабораторных тестов, известных специалистам в данной области техники.

При наличии клинических показаний можно отслеживать уровни активности фактора VIII в плазме крови пациента, например, при помощи одноэтапного анализа коагулирующей активности, для подтверждения того, что были достигнуты и сохраняются адекватные уровни фактора VIII. Дополнительно можно отслеживать появление в плазме крови пациента ингибиторов фактора VIII.

Пример 4. Клиническое исследование фазы 3 рекомбинантного продукта слияния фактора VIII и Fc с увеличенным периодом полувыведения (исследование "A-LONG").

Общее описание исследования A-LONG.

Для исследования A-LONG было отобрано 165 взрослых пациентов в возрасте от 12 лет и более. В исследовании A-LONG было три группы лечения: индивидуализированная профилактика, еженедельная профилактика и эпизодическое (по необходимости) лечение (группы 1, 2 и 3, соответственно). Для отдельной подгруппы пациентов из групп лечения rFVIIIc рассчитывали для периоперационного ведения пациентов, которым требовалась обширная хирургическая операция во время исследования.

Всего исследование было завершено для 92,7% пациентов. Рекомбинантный FVIIIc в целом оказался хорошо переносимым. У пациентов, которые все перешли с коммерчески доступных продуктов фактора VIII, не было выявлено ингибиторов rFVIIIc и не было зафиксировано случаев анафилаксии. Авторами изобретения не было обнаружено серьезных нежелательных явлений, связанных с лекарственным препаратом. Наиболее распространенными нежелательными явлениями (частота появления  $\geq 5\%$ ), которые возникали после периода периоперационного ведения, были назофарингит, артралгия, головная боль и инфекция верхних дыхательных путей. Медианные (средние) годовые показатели частоты кровотечений (ГПЧК), включая спонтанные и травматические кровотечения, составили 1,6 (2,9) в группе индивидуализированной профилактики, 3,6 (8,8) в группе еженедельной профилактики и 33,6 (37,2) в группе эпизодического лечения. В группе индивидуализированной профилактики медианный интервал дозирования составил 3,5 дня. На протяжении последних 3 месяцев исследования 30% пациентов в группе индивидуализированной профилактики достигли среднего интервала дозирования, составляющего по меньшей мере 5 дней.

Контроль кровотечений оценивали у всех пациентов, у которых во время исследования наблюдали эпизоды кровотечений. Всего 98% эпизодов кровотечений контролировались при помощи одной или двух инъекций rFVIIIc.

Кроме того, rFVIIIc оценивали в случае периоперационного ведения 9 пациентов, которым проводили 9 обширных хирургических операций. Лечащие врачи оценили гемостатическую эффективность rFVIIIc как превосходную или хорошую в 100% этих операций.

A-LONG включало проведение фармакокинетического (ФК) анализа rFVIIIc для всех пациентов в исследовании. В определенной протоколом подгруппе пациентов, в которой проводили масштабный отбор ФК проб, приблизительный конечный период полувыведения rFVIIIc составил 19,0 ч по сравнению с 12,4 ч для ADVATE® [антигемофилический фактор (рекомбинантный), метод без применения плазмы/альбумина], что согласуется с результатами, полученными в фазах 1/2 исследования rFVIIIc.

Об исследовании A-LONG и программе rFVIIIc.

A-LONG представляло собой глобальное, открытое, многоцентровое исследование фазы 3, в котором оценивали эффективность, безопасность и фармакокинетику вводимого внутривенно rFVIIIc. Исследование было разработано для того, чтобы оценить rFVIIIc в контроле и предотвращении кровотечений, стандартной профилактике и периоперационном ведении в случае пациентов с гемофилией А. В A-LONG были включены 60 центров лечения гемофилии в 19 странах на 6 континентах. В исследовании A-LONG было три группы лечения. В группе 1 (индивидуализированная профилактика; n=117) пациентов лечили при помощи 25-65 МЕ/кг rFVIIIc с интервалом, соответствующим от каждого трех до пяти дней, который был индивидуализирован для поддержания остаточных уровней фактора, достаточных для предотвращения кровотечения. В группе 2 (еженедельная профилактика; n=24), пациентов лечили при помощи еженедельной дозы, составляющей 65 МЕ/кг. В группе 3 (эпизодическое лечение; n=23), пациенты получали эпизодическое лечение rFVIIIc при необходимости в случае кровотечения. Для определенной подгруппы пациентов из групп лечения rFVIIIc оценивали в случае хирургической ситуации.

Первичными параметрами эффективности были годовой показатель частоты кровотечений для каждого пациента в группе 1 по сравнению с группой 3 и фармакокинетика rFVIIIc по сравнению с rFVIII

(одноэтапный анализ коагулирующей активности [активированное частичное тромбопластиновое время] и хромогенный анализ, откалиброванный относительно нормальной человеческой эталонной плазмы с эффективностью, соответствующей стандартам Всемирной организации здравоохранения). Конечные показатели безопасности включали частоту появления нежелательных явлений и появление ингибиторов (Ниймеген-модифицированный анализ Бетезда) у пациентов, исследуемых на протяжении до 54 недель. Вторичные конечные показатели эффективности включали ГПЧК в группе 2 по сравнению с группой 3, годовой показатель частоты спонтанных случаев кровотечения и случаев кровотечения в суставы для каждого пациента, количество инъекций и дозу, приходящуюся на инъекцию, для устранения кровотечения, а также оценку авторов изобретения ответа пациента на хирургическое вмешательство с применением rFVIIIc по шкале ответного кровотечения (только в случае подгруппы, в которой проводили хирургическое вмешательство), ответ на лечение эпизодов кровотечений и фармакокинетику rFVIIIc по сравнению с ADVATE®. Не являющиеся нейтрализующими антитела (NNA) оценивали методом анализа на основе электрохемилюминесценции с применением анти-rFVIIIc связывающего антитела.

Текущие клинические исследования rFVIIIc включают исследования Kids A-LONG и ASPIRE. Kids A-LONG представляет собой открытое исследование фазы 3, проводимое с предварительно прошедшими лечение детьми с гемофилией A в возрасте до 12 лет, в которое активно набирают пациентов. ASPIRE представляет собой долгосрочное открытое исследование, проводимое для пациентов, для которых было завершено исследование A-LONG, или для которых было завершено исследование Kids A-LONG.

Дизайн исследования A-LONG.

Дизайн: глобальное, открытое, многоцентровое исследование фазы 3. Протокол исследования был утвержден местными Экспертными советами организаций в случае каждой принимающей участие организации, а исследование проводили в соответствии с руководством по надлежащей клинической практике Международной конференции по гармонизации.

Цели: оценить эффективность и безопасность вводимого внутривенно белка слияния фактора VIII с Fc (rFVIIIc) в контроле и предотвращении эпизодов кровотечений, стандартной профилактике и периперационном ведении в случае индивидов с тяжелой формой гемофилии A.

Ключевые критерии включения.

Мужчина. Возраст  $\geq 12$  лет и масса по меньшей мере 40 кг.

Наличие диагноза тяжелой формы гемофилии A, определяемой как  $<1\%$  ( $<1$  ME/дл) активности эндогенного фактора VIII (FVIII).

Пациенты, ранее проходившие лечение (ПППЛ): история, включающая  $\geq 150$  ранее задокументированных дней приема (ДП) любого имеющегося в продаже на сегодняшний день продукта FVIII, прохождение профилактики  $\geq 2$  раз в неделю с применением продукта FVIII (только для группы 1) или  $\geq 12$  случаев кровотечений за последние 12 месяцев в эпизодическом режиме.

Отсутствие на данный момент/в прошлом ингибиторов FVIII с определяемой активностью.

Отсутствие истории наличия ингибиторов или истории появления аллергии или анафилаксии, связанной с введением какого-либо препарата FVIII или иммуноглобулина.

Все субъекты (или их опекуны в случае несовершеннолетних) дали письменное информированное согласие перед участием в исследовании.

Группы лечения: подробности дизайна исследования A-LONG описаны ниже.

Группе 1 (индивидуализированная профилактика) вводили 25-65 ME/кг каждые 3-5 дней (с максимальным 5-дневным интервалом дозирования). Субъектов лечили начальной дозой 25 ME/кг на 1 день и 50 ME/кг на 4 день, которую впоследствии корректировали, чтобы поддерживать остаточные уровни фактора, достаточные для предотвращения кровотечения. Дополнительные корректировки дозы для достижения целевых остаточных уровней, составляющих от 3 до 5 ME/дл, допускали через 7 недель, если у субъекта наблюдалось  $\geq 2$  умеренных/сильных кровотечений на протяжении учетного 8-недельного периода; от 10 до 20 ME/кг rFVIIIc (цель - 20-40 ME/дл FVIII) для незначительных эпизодов кровотечений; от 15 до 30 ME/кг rFVIIIc (цель - 30-60 ME/дл FVIII) для эпизодов кровотечений от умеренных до сильных; от 40 до 50 ME/кг rFVIIIc (цель - 80-100 ME/дл FVIII) для эпизодов кровотечений от сильных до составляющих угрозу жизни.

Группе 2 (еженедельная профилактика) вводили дозу 65 ME/кг. Субъектов лечили 65 ME/кг один раз в неделю без корректировки дозы или интервала дозирования. Группе 3 (эпизодическое [по необходимости] лечение) вводили 10-50 ME/кг. Субъекты получали эпизодическое лечение rFVIIIc при необходимости в случае кровотечения. Была создана подгруппа периперационного ведения. В этой подгруппе rFVIIIc вводили до и после хирургического вмешательства в подгруппе пациентов, которым требовалось проведение обширной хирургической операции во время исследования. В хирургическую подгруппу могли входить субъекты из любой группы лечения. Критерии отбора: необходимость обширного хирургического вмешательства;  $\geq 12$  дней приема rFVIIIc с отрицательным титром ингибиторов после этого периода и на протяжении 4 недель до хирургического вмешательства; и проведение, по меньшей мере, ускоренного отбора ФК проб.

Все субъекты (за исключением подгруппы с последовательной ФК) проходили отбор ФК проб до инъекции rFVIII-Fc и вплоть до 96 ч после инъекции в соответствии со схемой: до инъекции, через 30 ( $\pm 3$ ) мин, 3 ч ( $\pm 15$  мин), 72 ( $\pm 2$ ) ч (день 3) и 96 ( $\pm 2$ ) ч (день 4) от начала инъекции.

Проводили оценку фармакокинетики (ФК). Для всех субъектов во всех группах проводили начальную оценку ФК после первой дозы rFVIII-Fc. Подгруппа пациентов из группы 1 была приписана к установленной протоколом подгруппе с последовательной ФК, чтобы сравнить в динамике стабильность ФК свойств rFVIII-Fc с соответствующей характеристикой рекомбинантного фактора VIII (rFVIII, ADVATE® [антигемофилический фактор (рекомбинантный), метод без применения плазмы/альбумина], октоког альфа) следующим образом.

Перед лечением в группе 1 ФК оценивали после одной дозы ADVATE® в 50 МЕ/кг. Затем ФК оценивали для этих же субъектов после одной дозы rFVIII-Fc в 50 МЕ/кг.

ФК rFVIII-Fc повторяли через 12-24 недели.

Подробности плана дозирования и отбора ФК проб в случае подгруппы с последовательной ФК (группа 1) описаны на фиг. 1.

Ключевые выходные показатели эффективности (включенные в начальные данные).

- a. Годовой показатель частоты кровотечений (ГПЧК) в группе 1 по сравнению с группой 3.
- b. Сравнение группы индивидуализированной профилактики с группой с эпизодическим лечением.
- c. Количество инъекций, необходимое для устранения эпизода кровотечения.
- d. Количество инъекций, необходимое для устранения эпизодов кровотечений.
- e. Медианная доза, необходимая для устранения эпизодов кровотечений.
- f. Оценка лечащим врачом ответа субъекта на хирургическое вмешательство с применением rFVII-Fc по 4-балльной шкале.

Выходные показатели ФК включали:

a. первичная оценка ФК основывалась на уровнях активности FVIII, определяемых в центральной лаборатории при помощи одноэтапного анализа коагулирующей активности и хромогенного анализа против коммерчески доступных плазменных стандартов.

b. ФК для rFVIII-Fc и ADVATE®.

c. ФК свойства rFVIII-Fc сравнивали с rFVIII (ADVATE®; подгруппа с последовательной ФК). Общая продолжительность исследования составила  $\leq 75$  для всех субъектов. Первичным конечным показателем эффективности был годовой показатель частоты кровотечений (ГПЧК; группы 1 и 2 по сравнению с группой 3). Оценивали профилактическую дозу и интервал, количество инъекций, необходимых для лечения эпизодов кровотечений, и периоперационный гемостаз.

Ключевые выходные показатели безопасности включали:

a) частоту появления ингибиторов. Исследование дополнялось определением появления ингибиторов с 2-сторонним 95% доверительным интервалом с использованием точного метода Клоппера-Пирсона, если наблюдалось 2 случая образования ингибиторов;

b) частоту появления нежелательных явлений (НЯ), происходящих после периода периоперационного ведения.

Соблюдение режима лечения (показатели соблюдения режима лечения) оценивали, используя электронные дневники пациентов.

Результаты A-LONG.

Субъекты.

Для участия в исследовании всего было отобрано 165 субъектов. Средний возраст составлял 30 лет (диапазон 12-65), а 8% были <18 лет. Количество пациентов в каждой группе исследования составляло: группа 1 (индивидуализированная профилактика), n=118; группа 2 (еженедельная профилактика), n=24; группа 3 (эпизодическое лечение), n=23; и подгруппа периоперационного ведения, n=9, 9 хирургических вмешательств (8 субъектов из группы 1 и 1 из группы 2). Субъекты из каждой группы лечения подпадали под критерии отбора в хирургическую группу, если они нуждались в обширном хирургическом вмешательстве, имели  $\geq 12$  ДП rFVIII-Fc и отрицательный титр ингибиторов после этого периода и на протяжении 4 недель до хирургического вмешательства. Пациенты, которые ранее проходили эпизодическое лечение, характеризовались более высоким медианным количеством эпизодов кровотечения за 12 месяцев до исследования, а большая часть пациентов в группах 2 и 3 имели проблемные целевые суставы. В случае пациентов, которые ранее проходили профилактику, 87% сообщили о проведении инъекций по меньшей мере три раза в неделю. Исследование было завершено для 92,7% субъектов. Всего исследование было завершено для 153 (приблизительно 93%) субъектов; 112/118 (95%) в группе 1, 19/24 (79%) в группе 2 и 22/23 (96%) в группе 3. Причины досрочного прекращения участия были следующими: группа 1 - отказ субъекта от участия (n=2), решение врача (n=2), другое (n=1), смерть (n=1); группа 2 - отказ субъекта от участия (n=2; нежелательные явления (НЯ), возможно связанные с исследуемым лекарственным препаратом), НЯ (n=2), другое (n=1); группа 3 - другое (n=1).

Пол, раса и география субъектов были репрезентативными в отношении всего населения Земли с гемофилией А, которое имеет доступ к лечению, что обобщено в табл. 6.

Таблица 6. Демография субъектов A-LONG

Демография	Группа 1 (N=118)	Группа 2 (N=24)	Группа 3 (N=23)	Всего N=165
Возраст (лет), медиана (мин-макс)	29,0 (12-65)	31,5 (18-59)	34,0 (13-62)	30,0 (12-65)
Масса (кг), медиана (мин-макс)	71,65 (42,0- 127,4)	75,85 (50,0- 105,0)	70,00 (48,0- 110,4)	71,60 (42,0- 127,4)
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> ), медиана (мин-макс)	23,90 (15,3- 37,1)	24,60 (18,8- 37,4)	22,80 (17,2- 35,6)	23,90 (15,3- 37,4)
Раса, n (%)				
Белые	79 (66,9)	12 (50,0)	16 (69,6)	107 (64,8)
Черные	7 (5,9)	1 (4,2)	2 (8,7)	10 (6,1)
Азиаты	27 (22,9)	11 (45,8)	5 (21,7)	43 (26,1)
Другие	5 (4,2)	0	0	5 (3,0)
Географическое расположение — n (%)				
Европа	34 (28,8)	3 (12,5)	4 (17,4)	41 (24,8)
Северная Америка	44 (37,3)	5 (20,8)	7 (30,4)	56 (33,9)
Другие*	40 (33,9)	16 (66,7)	12 (52,2)	68 (41,2)
Генотип — n (%)				
Инверсия 22 интрона	41 (35,0)	7 (33,3)	9 (39,1)	57 (35,4)
Сдвиг рамки	24 (20,5)	4 (19,0)	6 (26,1)	34 (21,1)
Миссенс-мутация	22 (18,8)	4 (19,0)	1 (4,3)	27 (16,8)
Нонсенс-мутация	19 (16,2)	6 (28,6)	1 (4,3)	26 (16,1)
Изменение сайта сплайсинга	7 (6,0)	0	4 (17,4)	11 (6,8)
Инверсия 1 интрона	3 (2,6)	0	1 (4,3)	4 (2,5)
Дупликация НП	1 (0,9)	0	0	1 (0,6)
Антиген фактора Виллебранда — медиан. МЕ/дл (ИКД)	118,0 (85, 151)	129,0 (86, 166)	131,0 (83, 155)	118,0 (85, 153)
Схема приема FVIII до исследования — n (%)				
Профилактическая	87 (73,7)	0	0	87 (52,7)
Эпизодическая	31 (26,3)	24 (100)	23 (100)	78 (47,3)
Оценен. кол-во кровотечений в пред. 12 мес. — медиан. (ИКД) †	6,0 (2, 15)	--	--	6 (2, 15)
Предыд. профилактика	27,0 (17, 41)	29,5 (19, 44)	24,0 (15, 36)	27 (18, 40)
Предыд. эпизод. лечение				
≥1 Целевой сустав — n (%)	47 (39,8)	—	—	47 (28,5)
Предыд. профилактика	26 (22,0)	22 (91,7)	18 (78,3)	66 (40,0)
Предыд. эпизод. лечение				
Семейный анамнез наличия ингибиторов	4 (3,4)	1 (4,2)	2 (8,7)	7 (4,2)
ВИЧ-положительный	25 (21,2)	4 (16,7)	7 (30,4)	36 (21,8)
ВГС-положительный	55 (46,6)	14 (58,3)	13 (56,5)	82 (49,7)

ИМТ, индекс массы тела; ВИЧ, вирус иммунодефицита человека; ВГС, вирус гепатита С; МЕ/дл означает международные единицы на децилитр; ИМТ, индекс массы тела; ВИЧ, вирус иммунодефицита человека; ВГС, вирус гепатита С; НП - не применимо.

\*Другие включали Австралию, Новую Зеландию, Бразилию, Гонконг, Индию, Японию, Россию и Южную Африку.

† Расчет производился по доступным данным. Субъекты получали rFVIIIc в среднем на протяжении (мин-макс) 30,5 (<1-54) недель и в среднем (от минимума к максимуму) по группам 1, 2 и 3 на про-

тяжении 32,1 (9, 54), 28,0 (<1, 38) и 28,9 (15, 32) недель соответственно. Всего у 111 субъектов (67,7%) было >50 ДП исследуемого лекарственного препарата. Во время исследования было проведено всего 9356 инъекций, что соответствует 9170 ДП (100,2 пациенто-лет приема). В целом 93,6% пациентов в профилактических группах соблюдали предписанные дозы и интервал. В целом 93,6% пациентов в профилактических группах лечения придерживались предписанных дозы и интервала.

#### Эффективность.

В анализ эффективности было включено всего 163 субъекта. Один субъект был исключен, так как получал только ADVATE® (группа 1); другой субъект отказался от участия перед оценкой эффективности (группа 2). Медианные значения ГПЧК с 25- и 75-м процентилями (интерквартильный диапазон [ИКД]) были следующими: группа 1 - группа индивидуализированной профилактики: 1,6 (0,0, 4,7); группа 2 - группа еженедельной профилактики: 3,6 (1,9, 8,4); и группа 3 - группа эпизодического лечения: 33,6 (21,1, 48,7). Большинство эпизодов кровотечений были спонтанными. В группах 1, 2 и 3, соответственно, для 45,3, 17,4 и 0% не наблюдали эпизодов кровотечений, а для 13,7, 34,8 и 0% наблюдали 1 эпизод кровотечения.

#### Медианный интервал дозирования.

а. В группе индивидуализированной профилактики медианный интервал дозирования составлял 3,5 дней на протяжении последних 3 месяцев исследования.

б. Для 30% пациентов из группы индивидуализированной профилактики был достигнут интервал дозирования, составляющий по меньшей мере 5 дней.

с. В целом, медианный (ИКД) интервал дозирования в случае индивидуализированной профилактики, направленный на достижение остаточного FVIII, составляющего по меньшей мере от 1 до 3 МЕ/дл (с максимальным 5-дневным интервалом дозирования, разрешенным протоколом), составил 3,5 (3,2-4,4) дней (табл. 7) на основе средней (ИКД) еженедельной дозы в 78 (72-91) МЕ/кг.

д. Приблизительно для 30% субъектов был достигнут медианный интервал дозирования, составлявший 5 дней на протяжении последних 3 месяцев исследования. Для 100% субъектов средние интервалы дозирования составили  $\geq 2$  на протяжении исследования.

Медианная доза, приходящаяся на инъекцию, в случае эпизодического режима группы 3 составила 26,5 МЕ/кг (n=23), а медианная общая доза, приходящаяся на эпизод кровотечения, составила 27,4 МЕ/кг (n=23).

Таблица 7. Сравнительная фармакокинетика для rFVIIIc и rFVIII (n=28)<sup>1</sup>

ФК параметр	Среднее геометрическое для ФК rFVIIIc (95% ДИ)	Среднее геометрическое для ФК rFVIII (95% ДИ)	Среднее геометрическое интрасубъектного отношения
			(95% ДИ) p-критерий
Элиминационное t <sub>1/2</sub> (ч)	18,97 (17,03, 21,12)	12,43 (11,14, 13,86)	1,53 (1,36, 1,71) <0,001
CL (мл/ч/кг)	1,95 (1,71, 2,22)	3,041 (2,71, 3,41)	0,64 (0,60, 0,69) <0,001
Время до 1 МЕ/дл (дни) (доза 50 МЕ/кг)	4,92 (4,43, 5,46)	3,30 (2,99, 3,65)	1,49 (1,41, 1,57) <0,001

<sup>1</sup>Группа с последовательной ФК из группы 1, компартментная модель, одноэтапный анализ. Оценки и 95% ДИ для средних геометрических величин и соотношения средних геометрических величин; статистическая значимость, оцененная при уровне 0,05 для 2-стороннего критерия; ФК, фармакокинетика; ДИ, доверительный интервал; Смакс, максимальная концентрация; ППК, площадь под кривой; t<sub>1/2</sub>, период полувыведения; CL, клиренс; СВУ, среднее время удержания; Vss, объем распределения в стационарном состоянии.

Контроль кровотечений: приблизительно 98% (97,7%) эпизодов кровотечений контролировались посредством одной или двух инъекций rFVIIIc. 87,3% кровотечений контролировались посредством одной инъекции. Для 1,7% требовалось три инъекции. Периоперационное ведение: в целом было проведено 9 обширных хирургических вмешательств в случае 9 субъектов (8 субъектов из группы 1; 1 субъект из группы 2), включая артропластику коленного сустава (n=5), лапароскопическое паховое грыжесечение (n=2), удаление аппендикса (n=1) и артроскопию (n=1). Лечащие врачи оценили гемостатическую эффективность rFVIIIc как превосходную (8/9) или хорошую (1/9) в случае 100% хирургических вмешательств. Средняя (мин, макс) кровопотеря, оцененная для 7/9 хирургических вмешательств, составила 15,0 (0, 600) мл во время хирургического вмешательства и 0,0 (0, 1100) мл после операции; послеоперационный дренаж).

#### ФК.

Сравнительные ФК данные для rFVIIIc и ADVATE®, полученные от 28 субъектов из подгруппы с



последовательной ФК из группы 1, обобщены в табл. 7.

а. rFVIII<sup>Sc</sup> демонстрировал приблизительно на 50% больший период полувыведения (фиг. 2) и среднее время удержания, сопоставимое с ADVATE® ( $P < 0,001$ ), вследствие 35% снижения клиренса rFVIII<sup>Sc</sup> по сравнению с ADVATE®.

б. Среднее геометрическое время до 1 МЕ/дл активности FVIII после 50 МЕ/кг дозы составило приблизительно 5 дней для rFVIII<sup>Sc</sup> по сравнению с приблизительно 3 днями для ADVATE® ( $P < 0,001$ ; табл. 7, фиг. 2).

с. Постепенное восстановление в случае rFVIII<sup>Sc</sup> было клинически сопоставимо с ADVATE®.

д. Изменения ФК свойств rFVIII<sup>Sc</sup> не наблюдали, о чем свидетельствуют сопоставимые ФК свойства между исходными значениями и повторными ФК профилями rFVIII<sup>Sc</sup>.

е. Аналогичные ФК результаты были получены в случае анализа на основе хромогенного анализа FVIII.

ф. Одноэтапный и хромогенный анализы коагулирующей активности позволили аккуратно и точно провести измерения для rFVIII<sup>Sc</sup> и ADVATE®, используя коммерчески доступные плазменные стандарты FVIII.

Средний геометрический (95% доверительный интервал) конечный период полувыведения rFVIII<sup>Sc</sup> составил приблизительно 19,0 (17,0, 21,1) ч, что в 1,53 раз больше, чем в случае ADVATE® (приблизительно 12,4 (11,1, 13,9) ч). Среднее геометрическое время (ИКД) до 1% активности FVIII после 50 МЕ/кг rFVIII<sup>Sc</sup> составило приблизительно 5 дней (4,92 (4,43, 5,46) дней). Сопоставимые ФК профили rFVIII<sup>Sc</sup> наблюдали на 14 неделю. Медианный интервал дозирования в случае индивидуализированной профилактики составил 3,5 дней, а медианная доза на неделю составила 78 МЕ/кг; приблизительно для 30% был достигнут средний интервал дозирования  $\geq 5$  дней на протяжении последних 3 месяцев исследования (субъекты, более  $\geq 6$  месяцев принимавшие участие в исследовании), как показано в табл. 8. 98% эпизодов кровотечений контролировалось 1-2 инъекциями.

Таблица 8. Обобщенная информация по профилактическому дозированию

	n	Группа 1 Индивидуализированная профилактика	n	Группа 2 Недельная профилактика
Медианная доза, МЕ/кг/неделю (ИКД)				
Всего	117	77,9 (72,3, 91,2)	23	65,6 (64,2, 68,2)
Последние 3 месяца <sup>1</sup>	112	77,7 (71,9, 106,2)	16	65,5 <sup>2</sup> (64,3, 67,3)
Медианный интервал дозирования, дни (ИКД)				
Всего	117	3,5 (3,2, 4,4)		
Последние 3 месяца <sup>1</sup>	112	3,5 <sup>3</sup> (3,0, 5,0)		

<sup>1</sup>На основании последних 3 месяцев исследования для субъектов,  $\geq 6$  месяцев принимающих участие в исследовании.

<sup>2</sup>Фиксированная доза 65 МЕ/кг/нд.

<sup>3</sup>На основании данных фармакокинетики для 30% субъектов было достигнуто дозирование каждые 5 дней для поддержания остаточных уровней на от 1 до 3% выше исходного.

ИКД, интерквартильный диапазон.

Безопасность.

Ингибиторы rFVIII<sup>Sc</sup> выявлены не были, как не было сообщений о случаях анафилаксии, аллергии или серьезных тромботических случаях.

В целом rFVIII<sup>Sc</sup> оказался хорошо переносимым, и также не было обнаружено серьезных нежелательных явлений, которые были бы связаны с rFVIII<sup>Sc</sup>.

Наиболее распространенными НЯ, вне зависимости от причин (частота появлений  $\geq 5\%$ ), которые возникали после периода периоперационного ведения, были назофарингит, артралгия (боль в суставе), головная боль и инфекция верхних дыхательных путей, как обобщено в табл. 9.

У 12 субъектов (7,3%) наблюдалось по меньшей мере одно серьезное НЯ (СНЯ) после периода периоперационного ведения.

Авторами изобретения не было обнаружено СНЯ, которые были бы связаны с лекарственным препаратом.

Незначительное присутствие не являющихся нейтрализующими антител (NNA) наблюдали при проведении анализа NNA, который приблизительно в 20 раз более чувствительный, чем метода анализа Бетезда. Было обнаружено, что пять субъектов являются положительными в отношении NNA на исходном уровне, но все они имели по меньшей мере одну отрицательную оценку во время исследования. Шесть субъектов, четверо в группе исследования 1 и двое в группе исследования 2, стали положитель-

ными во время исследования. Однако почти во всех случаях антитела были временными и показывали низкий титр, и во всех случаях антитела были направлены против FVIII.

Всего сообщалось о появлении СНЯ у 14 (8,5%) субъектов. Ни одно СНЯ не было определено авторами изобретения как связанное с исследуемым лекарственным препаратом, а СНЯ, о которых сообщалось, наблюдали не более чем у 1 субъекта. Во время исследования случилась 1 смерть, связанная с передозировкой поливещества и оцененная автором изобретения как не относящаяся к rFVIII-Fc.

Таблица 9. Заключение по нежелательным явлениям (НЯ)

	<b>Всего N=164 n (%)</b>
Любое НЯ	108 (65,9)
Наиболее распространенные НЯ ( $\geq 5\%$ субъектов)	
Назофарингит	20 (12,2)
Артралгия	13 (7,9)
Головная боль	9 (5,5)
Инфекция верхних дыхательных путей	9 (5,5)

#### Заключение.

Индивидуализированный и еженедельный профилактические режимы привели к низким однозначным медианным годовым показателям частоты кровотечений.

В группе индивидуализированной профилактики средний интервал дозирования составил 3,5 дня. На протяжении последних 3 месяцев исследования для 30% пациентов в группе индивидуализированной профилактики был достигнут средний интервал дозирования, составлявший по меньшей мере 5 дней.

98% эпизодов кровотечения контролировались одной или двумя инъекциями rFVIII-Fc.

Всего проводили лечение 757 эпизодов кровотечений (группа 1 = 209; группа 2 = 92; группа 3 = 456) для 106 из 164 субъектов. Для 87,3% для устранения кровотечения требовалась одна инъекция rFVIII-Fc, а для 97,8% требовалось  $\leq 2$  инъекций. Всего было устранено 85,6, 80,4 и 89,5% эпизодов кровотечений при помощи 1 инъекции rFVIII-Fc в группах 1, 2 и 3 соответственно.

Гемостатическая активность rFVIII-Fc во время хирургического вмешательства была оценена лечащими врачами как превосходная или хорошая в 100% хирургических вмешательствах.

Период полувыведения rFVIII-Fc составил приблизительно 19,0 часов по сравнению с 12,4 ч для ADVATE®.

Ни у одного субъекта не наблюдали появление ингибиторов или аллергической реакции на rFVIII-Fc.

В целом, рекомбинантный FVIII-Fc оказался хорошо переносимым.

A-LONG представляло собой наибольшее регистрационное глобальное ключевое исследование фазы 3 в отношении rFVIII длительного действия при тяжелой форме гемофилии А, проводимое на сегодняшний день. Исследование показало, что rFVIII-Fc обладает потенциалом для существенного снижения частоты инъекций, снижения нагрузки лечения, улучшение клинических выходных показателей для предотвращения кровотечений у пациентов с тяжелой формой гемофилии А.

Цель дизайна исследования: исследование было разработано для того, чтобы оценить эффективность и безопасность rFVIII-Fc в контроле и предотвращении эпизодов кровотечений, стандартной профилактике и периоперационном ведении в случае пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Кроме того, исследование было разработано для того, чтобы оценить эффективную дозу и интервал rFVIII-Fc для профилактики, а также целесообразность еженедельного лечения дозой в 65 МЕ/кг.

Эпизодическое лечение представляет собой только введение замещающего фактора, когда возникает потребность в лечении эпизодов кровотечений после их начала. Профилактическое лечение представляет собой регулярное введение замещающего фактора для предотвращения эпизодов кровотечений.

Начальная схема соответствовала 25 МЕ/кг на 1 день и 50 МЕ/кг на 4 день. Дозу и частоту лечения можно корректировать на основании ФК профиля субъекта, а целью было поддержание остаточных уровней фактора, достаточных для предотвращения эпизодов кровотечений, с применением доз между 25 и 65 МЕ/кг и с интервалами лечения, составлявшими от 3 до 5 дней.

В США более половины пациентов с тяжелой формой гемофилии А до сих пор не придерживаются профилактического режима, частично вследствие лекарственной нагрузки. Поэтому в исследование A-LONG был включен режим еженедельного дозирования, чтобы оценить, приведет ли этот режим к более низким ГПЧК по сравнению с эпизодическим режимом. Медианный ГПЧК в случае еженедельного режима составил 3,59 (ИКД 1,9, 8,4) по сравнению с 33,6 (ИКД 21,1, 48,7) для эпизодического лечения. Для всех субъектов проводили начальную оценку ФК, чтобы получить ФК характеристики rFVIII-Fc в репрезентативной популяции пациентов с гемофилией А. Более масштабный отбор ФК проб проводили для подгруппы субъектов в группе индивидуализированной профилактики (группа 1) на исходном уровне после одной дозы ADVATE® (50 МЕ/кг) и после 4 дней вымывания с последующей одной дозой rFVII-

IFc (50 ME/kg). В случае ADVATE® образцы крови брали на протяжении периода, составлявшего 72 часа. В случае rFVIIIc образцы крови брали на протяжении периода, составлявшего 120 ч. Оценку ФК rFVIIIc в этой подгруппе повторяли через 12-24 недель согласно схеме отбора ФК проб.

В случае периоперационного введения одной дозы rFVIIIc было достаточно, чтобы поддерживать гемостаз до конца даты/времени всех обширных хирургических вмешательств при медианной дозе, составлявшей 51,4 ME/kg. Медианное потребление rFVIIIc (обобщенное по всем инъекциям за каждый определенный период времени) составило 80,6 ME/kg в день проведения обширного хирургического вмешательства, 161,3 ME/kg на 1-3 дни после хирургического вмешательства и 387,1 ME/kg на 4-14 дни после хирургического вмешательства. Периоперационный гемостаз при применении rFVIIIc был оценен как превосходный или хороший для всех 9 обширных хирургических вмешательств. Ни для одного субъекта не сообщалось об эпизодах кровотечений во время послеоперационного и реабилитационного периодов. Всего сообщалось о 7 нежелательных явлениях (НЯ) у 4 (44,4%) субъектов в хирургической подгруппе, из которых 6 НЯ характеризовались легкой или умеренной степенью тяжести, а 1 НЯ рассматривалось как тяжелое. Для 2 субъектов сообщалось о наличии двух серьезных НЯ (паховая грыжа и аппендицит). Все НЯ во время периоперационного периода были оценены авторами изобретения, как не связанные с лечением rFVIIIc.

Лечащие врачи оценили гемостатическую эффективность rFVIIIc как превосходную или хорошую в 100% хирургических вмешательств по 4-балльной шкале, включающей оценки превосходно, хорошо, удовлетворительно и плохо/без оценки.

rFVIIIc приводил к низким медианным ППЧК, составившим 3,59 в группе еженедельной профилактики и 1,60 в группе профилактики с индивидуализированным интервалом. В противоположность этому в группе эпизодического лечения медианный ППЧК составил 33,57.

В группе индивидуализированной профилактики медианный интервал дозирования составил 3,5 дней при медианной дозе 77,7 ME/kg на протяжении последних 3 месяцев исследования.

Конечный период полувыведения составил приблизительно 18,97 ч для rFVIIIc и приблизительно 12,3 ч для ADVATE®.

97,8% эпизодов кровотечений контролировались посредством одной или двух инъекций.

Гемостатическая эффективность rFVIIIc в случае периоперационного введения была оценена лечащими врачами как превосходная или хорошая в 100% хирургических вмешательств.

Группа 2 соответствовала еженедельной схеме дозирования. Она была разработана, чтобы изучить пользу профилактической терапии для пациентов и чтобы сравнить эти результаты с субъектами, в случае которых применяли схему эпизодического лечения.

Медианный ППЧК в группе 2 составил 3,59 по сравнению с 33,57 в случае схемы эпизодического лечения (группа 3).

Медианная доза, приходящаяся на инъекцию, необходимая для устранения кровотечения, составила 27,4 ME/kg, а необходимая медианная общая доза составила 28,2 ME/kg.

Медианное количество инъекций, необходимое для устранения эпизода кровотечения, стабильно составляло 1,0 при применении лечения в пределах 8 ч после начала кровотечения, вне зависимости от типа и места кровотечения. В целом 78,8% инъекций rFVIIIc в группе 1, 64,8% в группе 2 и 79,7% инъекций в группе 3, были оценены субъектами, как приводящие к превосходному или хорошему ответу. Медианный интервал дозирования в 3,5 дней в группе 1 представляет интервал дозирования, который может быть достигнут для большинства пациентов: 30% пациентов были способны достичь интервала дозирования, составлявшего по меньшей мере 5 дней. Некоторые пациенты были способны достичь такой еженедельной профилактической схемы (группа 2), при которой медианный ППЧК составлял 3,59 эпизодов кровотечений. Субъекты в группе индивидуализированной профилактики получали начальную дозу 25 ME/kg на 1 день и 50 ME/kg на 4 день. Дизайн исследования позволял корректировать интервал дозирования и дозировку, чтобы поддерживать целевые остаточные уровни фактора и предотвращать появление кровотечений. Мы считаем, что медианные интервал дозирования и дозировка на основании данных последних 6 месяцев исследования являются наиболее репрезентативными в случае индивидуализированной профилактической схемы.

87,3% эпизодов кровотечений были устранены посредством одной инъекции rFVIIIc, а 97,8% были устранены посредством одной или двух инъекций. В случае 96 (12,7%) эпизодов кровотечений, которые требовали более 1 инъекции для устранения, медианный интервал между первой и второй инъекцией составил 30,9 часов.

Общая оценка авторами изобретения ответа субъектов на предписанную им схему rFVIIIc соответствовала превосходной или эффективной для 99,4, 100 и 98,1% субъектов в группах 1, 2 и 3 соответственно.

В A-LONG активность фактора свертывания крови определяли, используя одноэтапный (aPTT) анализ коагулирующей активности и хромогенный анализ. Указанные периоды полувыведения основаны на результатах одноэтапного анализа коагулирующей активности. Несмотря на то что периоды полувыведения rFVIIIc и ADVATE® были немного большими согласно данным хромогенного анализа, соотно-

шения между продуктами были сопоставимы между этими двумя методами анализа.

### **Варианты реализации изобретения**

B1. Способ снижения годового показателя частоты кровотечений у субъекта с гемофилией, включающий введение субъекту эффективной дозы полипептида FVIII длительного действия с интервалом дозирования, составляющим около трех дней или более.

B2. Способ по варианту реализации изобретения B1, отличающийся тем, что введение является профилактическим и индивидуализированным для субъекта и приводит к годовому показателю частоты кровотечений меньшему, чем около 5,0, меньшему чем около 4,9, меньшему чем около 4,8, меньшему чем около 4,7, меньшему чем около 4,6 или меньшему чем около 4,5.

B3. Способ по варианту реализации изобретения B2, отличающийся тем, что медианный годовой показатель частоты кровотечений составляет около 1,6.

B4. Способ по варианту реализации изобретения B1, отличающийся тем, что введение является профилактическим и осуществляется раз в неделю и приводит к годовому показателю частоты кровотечений меньшему чем около 9,0, меньшему чем около 8,9, меньшему чем около 8,8, меньшему чем около 8,7, меньшему чем около 8,6, меньшему чем около 8,5 или меньшему чем около 8,4.

B5. Способ по варианту реализации изобретения B4, отличающийся тем, что медианный годовой показатель частоты кровотечений составляет около 3,6.

B6. Способ по варианту реализации изобретения B1, отличающийся тем, что введение осуществляется по необходимости или эпизодически и приводит к годовому показателю частоты кровотечений меньшему чем около 55, меньшему чем около 54, меньшему чем около 53, меньшему чем около 52, меньшему чем около 51, меньшему чем около 50, меньшему чем около 49, меньшему чем около 48 меньшему чем около 47.

B7. Способ по варианту реализации изобретения B6, отличающийся тем, что медианный годовой показатель частоты кровотечений составляет около 33,6.

B8. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B7, отличающийся тем, что эффективная доза составляет от около 20 МЕ/кг до около 90 МЕ/кг.

B9. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B8, отличающийся тем, что эффективная доза составляет 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 или 80-90 МЕ/кг.

B10. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B9, отличающийся тем, что эффективная доза составляет 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 МЕ/кг.

B11. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B8-B10, отличающийся тем, что введение является профилактическим и индивидуализированным с эффективной дозой, составляющей от около 25 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг дважды в неделю или каждые три дня или от около 50 МЕ/кг до около 65 МЕ/кг каждые 4 или 5 дней.

B12. Способ по варианту реализации изобретения B11, отличающийся тем, что первая вводимая доза полипептида FVIII длительного действия составляет около 25 МЕ/кг, а вторая доза полипептида FVIII длительного действия составляет около 50 МЕ/кг.

B13. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B8-B10, отличающийся тем, что введение является профилактическим и осуществляется раз в неделю с эффективной дозой, составляющей 65 МЕ/кг еженедельно.

B14. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B8-B10, отличающийся тем, что введение осуществляется по необходимости или эпизодически с эффективной дозой, составляющей от 10 до 75 МЕ/кг каждые 12-24 ч.

B15. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B7, отличающийся тем, что эффективная доза представляет собой фиксированную дозу, которая является стандартной для всех значений массы тела.

B16. Способ по варианту реализации изобретения B15, отличающийся тем, что фиксированная доза составляет около 2000 МЕ, около 2500 МЕ, около 3000 МЕ, около 3500 МЕ или около 4000 МЕ на дозу.

B17. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B7, отличающийся тем, что эффективная доза представляет собой стратифицированную дозу.

B18. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B17, отличающийся тем, что остаточный уровень полипептида FVIII длительного действия составляет более 1%, более 2% или более 3% от нормы.

B19. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B18, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия характеризуется  $T_{1/2\text{стаб}}$  (активности), составляющим от около 7 часов до около 48 ч, от около 6 ч до около 49 ч, от около 5 ч до около 50 ч.

B20. Способ по варианту реализации изобретения B19, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия характеризуется средним  $T_{1/2\text{стаб}}$  (активности), составляющим по меньшей мере около 15 ч, по меньшей мере около 16 ч, по меньшей мере около 17 ч, по меньшей мере около 18 ч, по меньшей мере около 19 ч, по меньшей мере около 20 ч, по меньшей мере около 21 часа, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч.

B21. Способ по варианту реализации изобретения B20, отличающийся тем, что среднее  $T_{1/2\text{стаб}}$  (ак-

тивности) составляет около 19 ч.

B22. Способ по варианту реализации изобретения B19-B20, отличающийся тем, что среднее  $T_{1/2\beta}$  (активности) является по меньшей мере в около 1,5 раз большим, чем в случае полипептида, состоящего из аминокислот от 20 до 1457 из SEQ ID NO:2, от 20 до 2351 из SEQ ID NO: 6 или ADVATE®.

B23. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B22, отличающийся тем, что плазменный остаточный уровень полипептида FVIII длительного действия сохраняется на уровне между около 1% и около 5%, между около 1% и около 6%, между около 1% и около 7%, между около 1% и около 8%, между около 1% и около 9%, между около 1% и около 10%, между около 1% и около 11%, между около 1% и около 12%, между около 1% и около 13%, между около 1% и около 14%, между около 1% и около 15% выше исходного уровня у субъекта.

B24. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B23, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия представляет собой полипептид FVIII длительного действия, содержащий полипептид FVIII и гетерологичный компонент.

B25. Способ по варианту реализации изобретения B24, отличающийся тем, что гетерологичный компонент является партнером по связыванию FcRn.

B26. Способ по варианту реализации изобретения B25, отличающийся тем, что партнер по связыванию FcRn содержит Fc-область.

B27. Способ по варианту реализации изобретения B25 или B26, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия дополнительно содержит второго партнера по связыванию FcRn.

B28. Способ по варианту реализации изобретения B27, отличающийся тем, что второй партнер по связыванию FcRn содержит вторую Fc-область.

B29. Способ по варианту реализации изобретения B27 или B28, отличающийся тем, что партнер по связыванию FcRn и второй партнер по связыванию FcRn ассоциированы.

B30. Способ по варианту реализации изобретения B29, отличающийся тем, что ассоциация представляет собой ковалентную связь.

B31. Способ по варианту реализации изобретения B30, отличающийся тем, что ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.

B32. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B27-B31, отличающийся тем, что второй партнер по связыванию FcRn не связан с аминокислотной последовательностью пептидной связью.

B33. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B32, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия представляет собой мономерно-димерный гибрид FVIII.

B34. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B24-B33, отличающийся тем, что полипептид FVIII в полипептиде длительного действия является человеческим FVIII.

B35. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B24-B34, отличающийся тем, что полипептид FVIII в полипептиде длительного действия является полноразмерным FVIII или FVIII с удаленным В-доменом.

B36. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B24-B34, отличающийся тем, что полипептид FVIII является одноцепочечным.

B37. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B24-B34, отличающийся тем, что полипептид FVIII является непротессированным.

B38. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B24-B34, отличающийся тем, что полипептид FVIII состоит из двух цепей, при этом первая цепь содержит тяжелую цепь полипептида FVIII, а вторая цепь содержит легкую цепь полипептида FVIII.

B39. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B25-B38, отличающийся тем, что партнер по связыванию FcRn в химерном полипептиде представляет собой Fc человека.

B40. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B24-B39, отличающийся тем, что полипептид FVIII является по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности FVIII, приведенной в табл. 11A или 11B без сигнальной последовательности (аминокислоты от 20 до 1457 из SEQ ID NO: 2 или аминокислоты от 20 до 2351 из SEQ ID NO: 6).

B41. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B25-B40, отличающийся тем, что партнер по связыванию FcRn является по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 11B без сигнальной последовательности (аминокислоты от 21 до 247 SEQ ID NO:4).

B42. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B27-B41, отличающийся тем, что второй партнер по связыванию FcRn в химерном полипептиде представляет собой Fc человека.

B43. Способ по варианту реализации изобретения B42, отличающийся тем, что второй партнер по связыванию FcRn является по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 11B без сигнальной последовательности (аминокислоты от 21 до 247 SEQ ID NO:4).

B44. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B43, отличающийся тем, что фикс-

сированная доза фактора свертывания крови предназначена для периоперационного ведения эпизода кровотечения.

В45. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В1-В44, отличающийся тем, что субъект нуждается в контроле или предотвращении кровотечения или эпизодов кровотечения.

В46. Способ по варианту реализации изобретения В45, отличающийся тем, что субъект нуждается в контроле или предотвращении кровотечения в случае кровоизлияния малого объема, гемартрозов, кровоизлияния в поверхностные мышцы, кровоизлияния в мягкие ткани, умеренного кровоизлияния, внутримышечного кровоизлияния или кровоизлияния в мягкие ткани с расслоением, кровоизлияния в слизистую оболочку, гематурии, обширного кровоизлияния, кровоизлияния в глотку, кровоизлияния в заглоточном пространстве, кровоизлияния в забрюшинном пространстве, кровоизлияния в центральной нервной системе, кровоизлияния, порезов, царапин, кровоизлияния в суставы, носового кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоточивости десен, внутричерепного кровотечения, внутрибрюшинного кровотечения, спонтанного кровоизлияния малого объема, кровотечения после обширной травмы, умеренных кровоизлияний на коже или спонтанных кровоизлияний в суставы, мышцы, внутренние органы или головной мозг.

В47. Способ по варианту реализации изобретения В46, отличающийся тем, что субъект нуждается в устранении кровотечения, связанного с хирургическим вмешательством или удалением зубов.

В48. Способ по варианту реализации изобретения В47, отличающийся тем, что субъекту будут проводить, проводят или проводили обширное хирургическое вмешательство.

В49. Способ по варианту реализации изобретения В48, отличающийся тем, что обширное хирургическое вмешательство представляет собой ортопедическую операцию, обширную стоматологическую операцию, урологическую операцию или грыжесечение.

В50. Способ по варианту реализации изобретения В49, отличающийся тем, что ортопедическая операция представляет собой замещение коленного, тазобедренного или одного из других основных суставов.

В51. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В1-В50, отличающийся тем, что субъект нуждается в долгосрочном лечении.

В52. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В1-В51, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия вводят внутривенно или подкожно.

В53. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В1-В52, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия входит в состав фармацевтической композиции, содержащей:

- (а) полипептид FVIII длительного действия;
- (b) один или более стабилизирующих агентов, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина и их смеси;
- (с) хлорид натрия (NaCl);
- (d) L-гистидин;
- (е) хлорид кальция; и
- (f) полисорбат 20 или полисорбат 80.

В54. Способ по варианту реализации изобретения В53, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция не содержит маннитол, глицин, аланин или гидроксиэтилкрахмал.

В55. Способ по варианту реализации изобретения В53 или В54, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит NaCl как единственный объемобразующий агент.

В56. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В55, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит сахарозу.

В57. Способ по варианту реализации изобретения В56, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы.

В58. Способ по варианту реализации изобретения В57, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 1,3% (мас./об.) сахарозы до около 2,0% (мас./об.) сахарозы.

В59. Способ по варианту реализации изобретения В58, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 1,33% (мас./об.) сахарозы или около 2,0% (мас./об.) сахарозы.

В60. Способ по варианту реализации изобретения В56, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы.

В61. Способ по варианту реализации изобретения В60, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 13 мг/мл до около 20 мг/мл сахарозы.

В62. Способ по варианту реализации изобретения В61, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 13,3 мг/мл сахарозы или около 20,0 мг/мл сахарозы.

В63. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В62, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 150 mM до около 250 mM NaCl.

В64. Способ по варианту реализации изобретения В63, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 175 mM до около 225 mM NaCl.

В65. Способ по варианту реализации изобретения В64, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 200 mM до около 210 mM NaCl.

В66. Способ по варианту реализации изобретения В65, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 205 мМ NaCl.

В67. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В62, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 8,8 мг/мл до около 14,6 мг/мл NaCl.

В68. Способ по варианту реализации изобретения В67, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 10 мг/мл до около 13 мг/мл NaCl.

В69. Способ по варианту реализации изобретения В68, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 12,0 мг/мл NaCl.

В70. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В62, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 250 мМ до около 350 мМ NaCl.

В71. Способ по варианту реализации изобретения В70, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 275 мМ до около 325 мМ NaCl.

В72. Способ по варианту реализации изобретения В71, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 308 мМ NaCl.

В73. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В62, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 14,6 мг/мл до около 20,5 мг/мл NaCl.

В74. Способ по варианту реализации изобретения В73, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 16 мг/мл до около 19 мг/мл NaCl.

В75. Способ по варианту реализации изобретения В74, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 18,0 мг/мл NaCl.

В76. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В75, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 5 мМ до около 15 мМ L-гистидина.

В77. Способ по варианту реализации изобретения В76, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 6,64 мМ L-гистидина или около 9,8 мМ L-гистидина.

В78. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В75, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина.

В79. Способ по варианту реализации изобретения В78, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 1,03 мг/мл L-гистидина или около 1,55 мг/мл L-гистидина.

В80. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В79, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 5 мМ до около 10 мМ хлорида кальция.

В81. Способ по варианту реализации изобретения В80, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 5,4 мМ хлорида кальция или около 8 мМ хлорида кальция.

В82. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В79, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция.

В83. Способ по варианту реализации изобретения В82, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция или около 1,18 мг/мл дигидрата хлорида кальция.

В84. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В83, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 0,008% (мас./об.) до около 0,025% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В85. Способ по варианту реализации изобретения В84, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80 или около 0,02 % (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В86. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В83, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В87. Способ по варианту реализации изобретения В86, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит около 0,13% мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80 или около 0,20 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В88. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В87, отличающийся тем, что полипептид rFVIII<sub>FC</sub> содержит первую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% или 95% идентичную аминокислотам от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% или 95% идентичную аминокислотам от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

В89. Способ по варианту реализации изобретения В88, отличающийся тем, что полипептид rFVII<sub>IFC</sub> содержит первую субъединицу, содержащую аминокислоты от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислоты от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

В90. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В89, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия присутствует в концентрации, составляющей от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл.

В91. Способ по варианту реализации изобретения В90, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит 83, 167, 250, 333, 500, 667, 1000, 1333, 1667 или 2000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия.

В92. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В89, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия присутствует в концентрации, составляющей от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл.

В93. Способ по варианту реализации изобретения В92, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит 150, 287,5, 431,25, 575, 862,5, 1150, 1725, 2300, 2875 или 3450 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия.

В94. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В56, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

- (a) от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;
- (b) от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы;
- (c) от около 150 мМ до около 250 мМ NaCl;
- (d) от около 5 мМ до около 15 мМ L-гистидина;
- (e) от около 5 мМ до около 10 мМ хлорида кальция; и
- (f) от около 0,008% (мас./об.) до около 0,025% полисорбата 20 или полисорбата 80.

В95. Способ по варианту реализации изобретения В94, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 175 мМ до около 225 мМ NaCl.

В96. Способ по варианту реализации изобретения В95, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 200 мМ до около 210 мМ NaCl.

В97. Способ по варианту реализации изобретения В96, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

- (a) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;
- (b) около 1,33% (мас./об.) сахарозы;
- (c) около 205 мМ NaCl;
- (d) около 6,64 мМ L-гистидина;
- (e) около 5,4 мМ хлорида кальция; и
- (f) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В98. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В56, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

- (a) от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;
- (b) от около 1% (мас./об.) до около 2,5% (мас./об.) сахарозы;
- (c) от около 250 мМ до около 350 мМ NaCl;
- (d) от около 5 мМ до около 15 мМ L-гистидина;
- (e) от около 5 мМ до около 10 мМ хлорида кальция; и
- (f) от около 0,008% (мас./об.) до около 0,025% полисорбата 20 или полисорбата 80.

В99. Способ по варианту реализации изобретения В98, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 275 мМ до около 325 мМ NaCl.

В100. Способ по варианту реализации изобретения В99, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

- (a) около 150 МЕ/мл, около 287,5 МЕ/мл, около 431,25 МЕ/мл, около 575 МЕ/мл, около 862,5 МЕ/мл, около 1150 МЕ/мл, около 1725 МЕ/мл, около 2300 МЕ/мл, около 2875 МЕ/мл или 3450 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;
- (b) около 2,0% (мас./об.) сахарозы;
- (c) около 308 мМ NaCl;
- (d) около 9,8 мМ L-гистидина;
- (e) около 8 мМ хлорида кальция; и
- (f) около 0,020% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

В101. Способ по любому из вариантов реализации изобретения В53-В56, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

- (a) от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;
- (b) от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы;
- (c) от около 8,8 мг/мл до около 14,6 мг/мл NaCl;
- (d) от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина;
- (e) от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и
- (f) от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

В102. Способ по варианту реализации изобретения В101, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 10 мг/мл до 13 мг/мл NaCl.

В103. Способ по варианту реализации изобретения В102, отличающийся тем, что фармацевтическая



композиция содержит:

(а) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;

(b) около 13,3 мг/мл сахарозы;

(с) около 12,0 мг/мл NaCl;

(d) около 1,03 мг/мл L-гистидина;

(е) около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и

(f) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

B104. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B53-B56, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

(а) от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;

(b) от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы;

(с) от около 14,6 мг/мл до около 20,5 мг/мл NaCl;

(d) от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина;

(е) от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и

(f) от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

B105. Способ по варианту реализации изобретения B104, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 16 мг/мл до около 19 мг/мл NaCl.

B106. Способ по варианту реализации изобретения B105, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

(а) около 150 МЕ/мл, около 287,5 МЕ/мл, около 431,25 МЕ/мл, около 575 МЕ/мл, около 862,5 МЕ/мл, около 1150 МЕ/мл, около 1725 МЕ/мл, около 2300 МЕ/мл, около 2875 МЕ/мл или 3450 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия;

(b) около 20,0 мг/мл сахарозы;

(с) около 18,0 мг/мл NaCl;

(d) около 1,55 мг/мл L-гистидина;

(е) около 1,18 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и

(f) около 0,20 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

B107. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B1-B52, отличающийся тем, что полипептид FVIII длительного действия находится в фармацевтическом наборе, содержащем:

(а) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит:

(i) полипептид FVIII длительного действия;

(ii) один или более стабилизирующих агентов, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина и их смеси;

(iii) хлорид натрия (NaCl);

(iv) L-гистидин;

(v) хлорид кальция; и

(vi) полисорбат 20 или полисорбат 80; и

(b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций для соединения с лиофилизированным порошком из первого контейнера.

B108. Способ по варианту реализации изобретения B107, отличающийся тем, что фармацевтический набор не содержит маннитол, глицин, аланин или гидроксипропилкрахмал.

B109. Способ по варианту реализации изобретения B107 или B108, отличающийся тем, что фармацевтический набор содержит NaCl в качестве единственного объемобразующего агента.

B110. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B107-B109, отличающийся тем, что фармацевтический набор содержит:

(а) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит:

(i) около 250 МЕ, около 500 МЕ, около 750 МЕ, около 1000 МЕ, около 1500 МЕ, около 2000 МЕ, около 3000 МЕ, около 4000 МЕ, около 5000 МЕ или около 6000 МЕ полипептида FVIII длительного действия;

(ii) около 40 мг сахарозы;

(iii) около 36 мг хлорида натрия;

(iv) около 3,1 мг L-гистидина;

(v) около 2,40 мг дигидрата хлорида кальция; и

(v) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и

(b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего:

(i) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл или около 1667 МЕ/мл, или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия, соответственно;

(ii) около 1,33% (мас./об.) сахарозы;

- (iii) около 205 мМ NaCl;
- (iv) около 6,64 мМ L-гистидина;
- (v) около 5,4 мМ хлорида кальция; и
- (vi) около 0,013% (мас./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80.

B111. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B107-B109, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

(a) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит:

(i) около 250 МЕ, около 500 МЕ, около 750 МЕ, около 1000 МЕ, около 1500 МЕ, около 2000 МЕ, около 3000 МЕ, около 4000 МЕ, около 5000 МЕ или около 6000 МЕ полипептида FVIII длительного действия,

(ii) около 40 мг сахарозы;

(iii) около 36 мг хлорида натрия;

(iv) около 3,1 мг L-гистидина;

(v) около 2,40 мг дигидрата хлорида кальция; и

(v) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и

(b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций в объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего:

(i) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII длительного действия, соответственно;

(ii) около 13,3 мг/мл сахарозы;

(iii) около 12,0 мг/мл NaCl;

(iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина;

(v) около 0,80 мг/мл хлорида кальция; и

(vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

B112. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B107-B111, отличающийся тем, что первый контейнер представляет собой стеклянный флакон с резиновой пробкой.

B113. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B107-B112, отличающийся тем, что второй контейнер представляет собой корпус шприца, при этом корпус шприца соединен с поршнем.

B114. Способ по варианту реализации изобретения B113, отличающийся тем, что фармацевтический набор дополнительно содержит адаптер для соединения стеклянного флакона с корпусом шприца.

B115. Способ по варианту реализации изобретения B113 или варианту реализации изобретения B114, отличающийся тем, что фармацевтический набор дополнительно содержит инфузионную трубку, соединенную с иглой для подсоединения к шприцу, подходящую для внутривенной инфузии.

B116. Способ по любому из вариантов реализации изобретения B70-B75, B92, B93, B98-B100 и B104-B106, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция представляет собой композицию до лиофилизации.

#### Таблица 10. Полинуклеотидные последовательности

A. FVIII<sub>FC</sub> с удаленным В-доменом.

(i) Последовательность ДНК цепи FVIII<sub>FC</sub> с удаленным В-доменом (сигнальный пептид FVIII выделен подчеркиванием, Fc-область выделена жирным текстом) (SEQ ID NO:1, которая кодирует SEQ ID NO:2)

661				A	TGCAAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	TGTGCCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC	
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCTCT	
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG	
901	TAGAATTAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC	
961	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG	
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAAGCT	TCTGAGGGAG	
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGCTG	
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC	
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT	
1321	TGCACAAAT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA	
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC	
1441	ACACAGTCAA	TGTTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT	
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACCTA	ATATTCCTCG	
1561	AAGGTCACAC	ATTTCCTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAATAT	TCGCCAATAA	
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGACAC	GTTTCTACTG	TTTTGTCTATA	
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGTATG	ATGACAACCTC	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC	
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG	
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCTCGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT	
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATAACA	
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT	
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC	
2161	CATATAACAT	CTACCCCTCAC	GGAATCACTG	ATGTCGGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC	
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC	AGGAGAAAAT	TTCAAAATATA	
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT	
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC	
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA	
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC	
2521	AACGCTTTCT	CCCAATCCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCCTCCA	
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTGTTG	
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTTCTGTCT	
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCATTTCC	
2761	CATTCTCAGG	AGAACTGTGC	TTTATGTCTGA	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT	
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG	
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTACAGCA	TACTTGCTGA	
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCACTC	TTGAAACGCC	
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT	
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	
3541	CTAAAGATGA	GTTTGAATGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG	
3601	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACATAACACA	CTGAACCCCTG	
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA	
3721	CCAAAAGCTG	GTACTTCACT	GAAAATATGG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	
3781	AGATGGAAGA	TCCCACTTTT	AAAGAGAAAT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	

```

3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGA ATGCCTTATT GGCGAGCATC
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCAATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCTT CCAATTATTG
4501 CTCGATACAT CCGTTTGAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCTACTT 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 CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTGAGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTACACCTC GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC
5101 TCCTGGGCGG ACCGTCAGTC TTCTCTCTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAAGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCCTCCCGT GTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCTCTG CTCCGGGTAA A

```

(ii) Последовательность ДНК Fc (сигнальный пептид мышиног Igκ выделен подчеркиванием) (SEQ ID NO:3, которая кодирует SEQ ID NO:4)

```

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
8161 AAACCCAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
8341 CTCACCGTCC TGCACCAAGG CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
8521 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT STATCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
8641 CTCTACAGCA AGCTACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTAAA

```

#### В. Полноразмерный FVIII<sub>FC</sub>.

(i) Последовательность ДНК полноразмерного FVIII<sub>FC</sub> (сигнальный пептид FVIII выделен подчеркиванием, Fc-область выделена жирным текстом) (SEQ ID NO:5, которая кодирует SEQ ID NO:6)

```

661                                     ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
721 CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTGGGTGC
781 AGTGGAACCTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
841 ATTTCTCCTT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCGTGT AAAAAAGAC
901 TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
961 GGGTCTGCTA GGTCTACCA TCCAGGCTGA GGTATATGAT 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 GGGCCTGGCC
1441 TAAATGTCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCCTCAAT
1561 ATTCCTCGAA GGTACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC CAGGCGTCCT TGGAAATCTC-
1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681 TTGTATATC TCTTCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACTCTC CTTCTTTTAT
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC GATGACAGAA GTTATAAAG
1981 TCAATATTTG AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCCTT TGTATTCAAG
2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTGTAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT TGGAGAGAGT CTAGCTTCAG GACTCATTTG
2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GAAACCCAGA TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCA GCTTGAGGATC 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 TGAAGTTTTT
2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTTCAAGATA
2941 CTTGCTGAGT AAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC
3061 TGACCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCTTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT
3301 TACCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTTGAAG AAAGTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAGTAT
3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCT
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAA AATGATTCAA AGTTGTTAGA
3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAAGTT ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG
3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC
3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG
3841 GCAAAATATA TTAGAAAAGT ACACAGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTCATGACAG
3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAACTAC
3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG GGCCCCATTC CACCAGATGC
4021 ACAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT

```

```

4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCCAGTC CAAAGCAATT
4141 AGTATCTCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTGAGAAAT TTCTTGTCTG AGAAAAACAA
4201 AGTGGTAGTA GGAAGGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTC TTACTAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA
4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT
4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAAT TTCATGAAGA ACCTTTTCTT
4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA
4501 AGATTTTAGG TCATTAATG ATTCACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG CTCATTTCTC
4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATTGTAGA
4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTACGCA
4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCACTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801 GAGCACCCCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAATAGAT CTCCTATTACC
4921 CATTGCAAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTTAT
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGGTCCA
5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTCTAAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC
5221 TGGCAAGGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTTATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA
5281 AACTAGCAAT GGGTCTCTCG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAAA 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 TGGCAGAGCA
5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA
5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT GACTATGATG ATACCATATC
5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC AGGCCCCCG
5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAG GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
5881 TGGGATGAGT AGTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA
5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG
6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
6061 TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCTTCTT ATTCTAGCCT
6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT TTGTCAAGCC
6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAGATGTA
6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTCTCT TGATGTTGAC TTGGAAGAGT ATGTGCCTC
6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCTTG CTCATGGGAG
6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCAACATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG
6421 GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481 TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT
6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTGATGAG TATCTGCTCA GCATGGGCAG
6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTCAG TGGACATGTG TTTACTGTAC GAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GCGGAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCCAA
6901 GCTGGCCAGA CTTCAATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTACG GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
7021 CCGTCAGAAG TTTCTCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCCT CCAATTATTG CTCGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACCTACT AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAAGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTACACCTT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCTCCAGAAC TCTTGGGCGG
7801 ACCGTGAGTC TTCCTCTTCC CCCCCAACCC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC
7861 TGAGGTCACA TGGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG

7921 GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA
7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCTGTCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
8041 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC
8101 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCT GAGAACACCA GGTGTACACC CTCGCCCCAT CCGGGATGA
8161 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCGACC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
8401 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

```

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

Таблица 11. Полипептидные последовательности

А. Мономерно-димерный гибрид FVIII-Fc с удаленным В-доменом (мономерно-димерный BDD FVIII-Fc): получен путем коэкспрессии цепей BDD FVIII-Fc и Fc.

Конструкция - продукт слияния HC-LC-Fc. Fc-экспрессионную кассету котрансфицируют вместе с

BDDFVIII-Fc для получения мономерного BDD FVIII-Fc. Для цепи BDD FVIII-Fc последовательность Fc выделена жирным текстом; последовательность HC выделена двойным подчеркиванием; остаток последовательности В-домена выделен курсивом. Сигнальные пептиды выделены подчеркиванием.

i) цепь FVIII-Fc с удаленным В-доменом (19-аминокислотная сигнальная последовательность выделена подчеркиванием) (SEQ ID NO:2)

MQIELSTCFFLCCLRFCFS  
ATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPVDAREFPPRVPKSEFENTSVVYKKTLEVEFTDHLF  
NIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ  
TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA  
LLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT  
VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPFVHSIFLEGHTFLVRNHROASLEISPTFL  
TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD  
SEMDVVRFDNDDNSPSEFQIRSVAKKHPKTWVHYIAEEEDWDYAPLV LAPDDRYSYKSO  
YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIIFKNQAS  
RPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLT  
RYSSSFVNMERDLASGLIGPLICYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFENRNSWYLTEN  
IQRFPLNPAGVOLEDPEFOASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS  
VFFSGYTFKKHMKVYEDTLTLPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFNRGMTALLKV  
SSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPPIVLRHQREITRTTLQSDQEEID  
YDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNA  
QSGSVQFKKVVVFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGGLPYIRAEVEDNIMVTFNRQASRP  
YSFYSSLISYEEDQROGAEPKRNFKVNETKTYFWKVQHHPAPTCKDEFDCKAWAYFSD  
VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERN  
RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFS  
GHVFTVRKKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGELHAGMSTLFLVY  
SNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLL  
APMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK  
HNIFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN  
MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTS  
MYFYKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLTRYLRIHPQSW  
VHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
**WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL**  
**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS**  
**CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

ii) цепь Fc (20-аминокислотный гетерологичный сигнальный пептид из цепи мышиного Igk выделен подчеркиванием) (SEQ ID NO:4)

METDTLLLWVLLLWVPGSTG  
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS**CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

В. Полноразмерный мономерный гибрид FVIII-Fc (полноразмерный мономерно-димерный FVIII-Fc):  
получен путем коэкспрессии цепей FVIII-Fc и Fc.

Конструкция - продукт слияния HC-B-LC-Fc. Fc-экспрессионную кассету котрансфицируют вместе с полноразмерным FVIII-Fc для получения полноразмерного мономера FVIII-Fc. Для цепи FVIII-Fc последовательность Fc выделена жирным текстом; последовательность HC выделена двойным подчеркиванием; последовательность В-домена выделена курсивом. Сигнальные пептиды выделены подчеркиванием.

i) Полноразмерная цепь FVIII-Fc (сигнальный пептид FVIII выделен подчеркиванием) (SEQ ID NO:6)

MQIELSTCFCLLRFCFS

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLF  
NIAKPRPPWMGLLGPTIOAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ  
TSOREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA  
LLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFEDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT  
VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVMYWHVIGMGTTPFVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTFL  
TAOTLLMDLGOELLFCHISSHOHDGMEAYVKVDSCPEEPOLRMKNNEEAEDYDDDLTD  
SEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTVVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQ  
YLNNGPQORIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIIFKNQAS  
RPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLT  
RYYSFVNMRDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNOIMSDKRNVLFSVFENRSWYLTEN  
IORFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS  
VFFSGYTFKHKVMYEDTLTLPFSGETVFMMSMENPGLWILGCHNSDFNRGMTALLKV  
SSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATIPENDIEKTD  
PWFahrTPMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTHGLSLSDLEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSLSE  
MTHFRPQLHHSMDMVFTPESEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLSTIPSDNLAA  
GTDNSSLGPPSMPVHYDSQLDTLFGKKSSPLTESGGPLSLSENNDSKLLSEGLMNSQESS  
WGNVSSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIE  
NSPSVWQNILEDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQOKKEGPI  
PPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWJQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVQGNFLSEK  
NKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEIEKKETLIQENV  
VLQIHTVTGKTNFMKNLFLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHF  
GEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDD  
TSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPSLDCLTRSHSIPQANRSLPIAKVSSFPSIRP  
IYLRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTEMTGDQREVGSLGTS

*ATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVLLPKVHIYQKDLFPTETSNNGSPGHLDLVEGSLLOQ*  
*TEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKPT*  
*AFKKKDITLSLNACESNHAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRHOREITRT*  
*TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMS*  
*SSPHVLRNRAQSGSVQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLPYIRAEVEDNIM*  
*VTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKYFWKVQHMMAPTKDEFD*  
*CKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFTIFDETKSWY*  
*FTENMERNCRAPCNQIMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMG*  
*SNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLH*  
*AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK*  
*EPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMV*  
*FFGNVDSSGKHNIFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD*  
*AQITASSYFTNMFAWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT*  
*TQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDVPLLT*  
*RYLRIHPQSVVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK*  
*DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV*  
*SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK*  
*KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR*  
*RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

ii) цепь Fc (20-аминокислотный гетерологичный сигнальный пептид из цепи мышиного Igk выделен подчеркиванием) (SEQ ID NO:4)

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP  
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Вышеприведенное описание конкретных вариантов реализации изобретения в настолько полной мере раскрывает общую сущность данного изобретения, что другие специалисты на основании знаний, соответствующих данной области техники, могут без труда модифицировать и/или адаптировать эти конкретные варианты реализации изобретения для различных применений без проведения лишних экспериментов, не отступая при этом от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, на основании представленных в данном документе принципов и руководств считается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах смысла и серии эквивалентов раскрытых вариантов реализации изобретения. Следует понимать, что употребляемая в данном документе фразеология или терминология имеет описательную, но не ограничительную цель, поэтому фразеология или терминология настоящего описания должна интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете указанных принципов и руководств.

Существование других вариантов реализации изобретения должно быть очевидным для специалистов в данной области техники после изучения описания и практической реализации изобретения, раскрытых в данном документе. Описание изобретения и примеры следует рассматривать исключительно в качестве типовых примеров, при этом настоящий объем и сущность изобретения установлены нижепри-



веденной формулой изобретения.

Все патенты и публикации, на которые в данном документе приведены ссылки, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:
  - (a) от около 50 МЕ/мл до около 2500 МЕ/мл полипептида FVIII;
  - (b) от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы;
  - (c) от около 8,8 мг/мл до около 14,6 мг/мл хлорида натрия (NaCl);
  - (d) от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина;
  - (e) от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция и
  - (f) от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.
2. Фармацевтическая композиция, содержащая:
  - (a) от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл полипептида FVIII;
  - (b) от около 10 мг/мл до около 25 мг/мл сахарозы;
  - (c) от около 14,6 мг/мл до около 20,5 мг/мл NaCl;
  - (d) от около 0,75 мг/мл до около 2,25 мг/мл L-гистидина;
  - (e) от около 0,75 мг/мл до около 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция; и
  - (f) от около 0,08 мг/мл до около 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.
3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, содержащая от около 13 мг/мл до около 20 мг/мл сахарозы.
4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, содержащая около 13,3 мг/мл сахарозы.
5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, содержащая около 20,0 мг/мл сахарозы.
6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1 и 3-5, содержащая от около 10 мг/мл до 13 мг/мл NaCl.
7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1 и 3-6, содержащая около 12,0 мг/мл NaCl.
8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.2-5, содержащая около 18 мг/мл NaCl.
9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, содержащая около 1,03 мг/мл L-гистидина.
10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, содержащая около 1,55 мг/мл L-гистидина.
11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, содержащая около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, содержащая около 1,18 мг/мл дигидрата хлорида кальция.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, содержащая около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.
14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, содержащая около 0,20 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.
15. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-14, содержащая около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-15, содержащая:
  - (a) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII;
  - (b) около 13,3 мг/мл сахарозы;
  - (c) около 12,0 мг/мл NaCl;
  - (d) около 1,03 мг/мл L-гистидина;
  - (e) около 0,8 мг/мл дигидрата хлорида кальция и
  - (f) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.
17. Фармацевтический набор, содержащий:
  - (a) первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, при этом порошок содержит:
    - (i) около 250 МЕ, около 500 МЕ, около 750 МЕ, около 1000 МЕ, около 1500 МЕ, около 2000 МЕ, около 3000 МЕ, около 4000 МЕ, около 5000 МЕ или около 6000 МЕ полипептида FVIII,
    - (ii) около 40 мг сахарозы;
    - (iii) около 36 мг хлорида натрия;
    - (iv) около 3,1 мг L-гистидина;
    - (v) около 2,40 мг дигидрата хлорида кальция и
    - (vi) около 0,40 мг полисорбата 20 или полисорбата 80; и
  - (b) второй контейнер, содержащий стерильную воду для инъекций, которая подлежит объединению с лиофилизированным порошком первого контейнера.
18. Фармацевтический набор по п.17, в котором второй контейнер содержит стерильную воду в

объеме, достаточном для получения при соединении с лиофилизированным порошком из первого контейнера раствора, содержащего:

(i) около 83 МЕ/мл, около 167 МЕ/мл, около 250 МЕ/мл, около 333 МЕ/мл, около 500 МЕ/мл, около 667 МЕ/мл, около 1000 МЕ/мл, около 1333 МЕ/мл, около 1667 МЕ/мл или около 2000 МЕ/мл полипептида FVIII соответственно;

(ii) около 13,3 мг/мл сахарозы;

(iii) около 12,0 мг/мл NaCl;

(iv) около 1,03 мг/мл L-гистидина;

(v) около 0,80 мг/мл дигидрата хлорида кальция и

(vi) около 0,13 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80.

19. Фармацевтический набор по п.17 или 18, отличающийся тем, что первый контейнер представляет собой стеклянный флакон с резиновой пробкой.

20. Фармацевтический набор по любому из пп.17-19, отличающийся тем, что второй контейнер представляет собой корпус шприца.

21. Фармацевтический набор по п.20, отличающийся тем, что корпус шприца соединен с поршнем.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-16, отличающаяся тем, что полипептид FVIII представляет собой полипептид FVIII длительного действия, содержащий полипептид FVIII и гетерологичный компонент.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, отличающаяся тем, что гетерологичный компонент является партнером по связыванию FcRn.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, отличающаяся тем, что партнер по связыванию FcRn содержит Fc-область.

25. Фармацевтическая композиция по п.23 или 24, отличающаяся тем, что химерный полипептид FVIII дополнительно содержит второго партнера по связыванию FcRn.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, отличающаяся тем, что второй партнер по связыванию FcRn содержит вторую Fc-область.

27. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, отличающаяся тем, что партнер по связыванию FcRn и второй партнер по связыванию FcRn ассоциированы.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, отличающаяся тем, что ассоциация представляет собой ковалентную связь.

29. Фармацевтическая композиция по любому из пп.22-28, отличающаяся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII является полноразмерным FVIII или FVIII с удаленным В-доменом.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.22-29, отличающаяся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII является одноцепочечным.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.22-30, отличающаяся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII состоит из двух цепей, при этом первая цепь содержит тяжелую цепь полипептида FVIII, а вторая цепь содержит легкую цепь полипептида FVIII.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-16 и 22-31, отличающаяся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII содержит первую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или аминокислотам от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-16 и 22-32, отличающаяся тем, что полипептид FVIII содержит первую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или аминокислотам от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

34. Фармацевтическая композиция по п.33, отличающаяся тем, что первая субъединица содержит аминокислоты от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, а вторая субъединица содержит аминокислоты от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

35. Фармацевтический набор по любому из пп.17-21, отличающийся тем, что полипептид FVIII представляет собой полипептид FVIII длительного действия, содержащий полипептид FVIII и гетерологичный компонент.

36. Фармацевтический набор по п.35, отличающийся тем, что гетерологичный компонент является партнером по связыванию FcRn.

37. Фармацевтический набор по п.36, отличающийся тем, что партнер по связыванию FcRn содержит Fc-область.

38. Фармацевтический набор по п.36 или 37, отличающийся тем, что химерный полипептид FVIII дополнительно содержит второго партнера по связыванию FcRn.

39. Фармацевтический набор по п.38, отличающийся тем, что второй партнер по связыванию FcRn содержит вторую Fc-область.

40. Фармацевтический набор по п.38 или 39, отличающийся тем, что партнер по связыванию FcRn и второй партнер по связыванию FcRn ассоциированы.

41. Фармацевтический набор по п.40, отличающийся тем, что ассоциация представляет собой ковалентную связь.

42. Фармацевтический набор по любому из пп.35-41, отличающийся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII является полноразмерным FVIII или FVIII с удаленным В-доменом.

43. Фармацевтический набор по любому из пп.35-42, отличающийся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII является одноцепочечным.

44. Фармацевтический набор по любому из пп.35-43, отличающийся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII состоит из двух цепей, при этом первая цепь содержит тяжелую цепь полипептида FVIII, а вторая цепь содержит легкую цепь полипептида FVIII.

45. Фармацевтический набор по любому из пп.17-21 и 35-44, отличающийся тем, что полипептид FVIII в химерном полипептиде FVIII содержит первую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или аминокислотам от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

46. Фармацевтический набор по любому из пп.17-21 и 35-45, отличающийся тем, что полипептид FVIII содержит первую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или аминокислотам от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, и вторую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

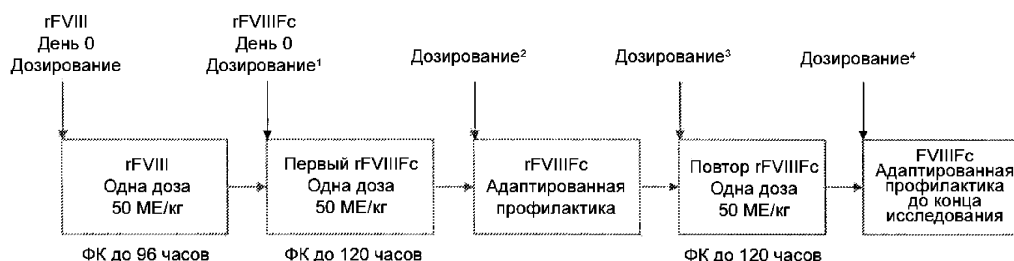
47. Фармацевтический набор по п.46, отличающийся тем, что первая субъединица содержит аминокислоты от 20 до 1684 из SEQ ID NO:2 или от 20 до 2578 из SEQ ID NO:6, а вторая субъединица содержит аминокислоты от 21 до 247 из SEQ ID NO:4.

48. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-16 и 22-34 или фармацевтического набора по любому из пп.17-21 и 35-47 для производства медикамента для снижения или уменьшения одного или более эпизодов кровотечения или их частоты у нуждающегося в этом субъекта.

49. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-16 и 22-34 или фармацевтического набора по любому из пп.17-21 и 35-47 для производства медикамента для лечения или предотвращения состояния кровотечения у нуждающегося в этом субъекта.

50. Применение по п.49, отличающееся тем, что причиной состояния кровотечения является нарушение свертываемости крови.

51. Применение по п.50, отличающееся тем, что нарушение свертываемости крови является гемофилией.



1. Минимальный интервал - 96 ч, максимальный интервал - 8 недель от инъекции rFVIII до первой инъекции 50 ME/kg rFVIII Fc для получения последовательного ФК профиля.

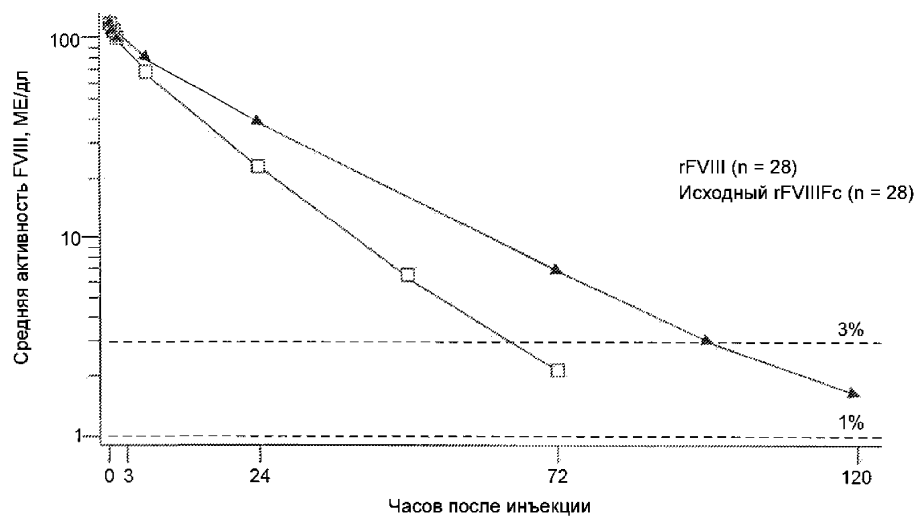
2. Начальная схема для осуществляемой дважды в неделю индивидуализированной (адаптированной) профилактики с 25 ME/kg в первый день и далее 50 ME/kg на четвертый день, при этом дозу и интервал корректируют, чтобы достичь целевого остаточного уровня, составляющего приблизительно от 1 до 3% (или выше согласно клиническим данным). Оценивают пиковый и остаточный уровень FVIII.

3. Повторная доза 50 ME/kg rFVIII Fc для получения последовательного ФК профиля, вводимая на 14 неделю или на 12-14 неделю после первой инъекции rFVIII Fc.

4. Продолжение индивидуализированной профилактической схемы от 28 ( $\pm$ 2) недель до 52 ( $\pm$ 2) недель.

ФК - фармакокинетика.

Фиг. 1



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2