

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035323

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.28

(51) Int. Cl. A61K 38/37 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791134

(22) Дата подачи заявки
2013.01.12

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ ХИМЕРНОГО ФАКТОРА VIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/586,099; 61/586,654; 61/667,901;
61/734,954

(56) WO-A2-2008057683
WO-A1-2011101284
WO-A2-2011060242
US-A1-20080255040
US-A1-20040235734
WO-A1-2009156137

(32) 2012.01.12; 2012.01.13; 2012.07.03;
2012.12.07

(33) US

(43) 2018.02.28

(62) 201491186; 2013.01.12

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

(72) Изобретатель:
Чабра Экта Сет, Лю Туняо, Питерс
Роберт, Цзян Хайян (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

035323 B1

(57) В изобретении предложены фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3 ФВ, химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и гетерологичный компонент, или химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, а также способы их применения. Полипептидная цепь, содержащая фрагмент ФВ, являющегося объектом изобретения, связывается или является соединенной с полипептидной цепью, содержащей белок Ф VIII, и полипептидная цепь, содержащая фрагмент ФВ, может предотвращать или подавлять связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII. Путем предотвращения или подавления связывания эндогенного ФВ с Ф VIII, которое является фактором, ограничивающим время полужизни связывания эндогенного ФВ с белком Ф VIII, фрагмент ФВ может индуцировать продление времени полужизни белка Ф VIII. Изобретение также включает в себя нуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, способы применения фрагмента ФВ или химерные белки.

B1

035323

Уровень техники

Свертывание является сложным процессом образования кровью тромбов.

Важной частью гемостаза является прекращение тока крови из поврежденного сосуда, при котором стенка поврежденного сосуда покрывается бляшками и содержащими фибрин тромбами для того, чтобы остановить кровотечение и начать восстановление поврежденного сосуда. Нарушения свертываемости крови могут привести к повышенному риску возникновения кровотечений (геморрагии) или образованию закупоривающих тромбов (тромбозу).

Свертывание начинается практически сразу после того, как при повреждении кровеносного сосуда была повреждена эндотелиальная выстилка сосуда. Воздействие на кровь таких белков, как тканевой фактор, инициирует изменения в тромбоцитах и плазменном белке фибриногене - факторе свертывания крови. Тромбоциты мгновенно образуют пробку в месте повреждения; это называется первичным гемостазом. Одновременно происходит вторичный гемостаз: белки, находящиеся в плазме крови, которые называются факторами коагуляции или факторами свертывания крови, откликаются сложным каскадом реакций, образуя фибриновые нити, которые укрепляют тромбоцитарную пробку. Неограничивающие факторы коагуляции включают, но не ограничиваются этим, фактор I (фибриноген), фактор II (протромбин), тканевой фактор, фактор V (проакцептерин, лабильный фактор), фактор VII (стабильный фактор, проконвертин), фактор VIII (антигемофильный глобулин А), фактор IX (антигемофильный глобулин В или кристмас-фактор), фактор X (фактор Стюарта-Прауэра), фактор XI (плазменный предшественник тромбопластина), фактор XII (фактор Хагемана), фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор), ФВ, прекалликреин (фактор Флетчера), высокомолекулярный кининоген (ВМК) (фактор Фитцджеральда), фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, протеин С, протеин S, протеин Z, плазминоген, α_2 -антiplазмин, тканевой активатор плазминогена (ТАП), урокиназа, ингибитор активатора плазминогена-1 (ИАП-1), ингибитор активатора плазминогена-2 (ИАП-2).

Гемофилия А является нарушением свертываемости крови, возникающим из-за дефектов в гене, кодирующем фактор коагуляции VIII (Ф VIII), и проявляющимся у 1-2 из 10000 младенцев мужского пола. Grawetal., Nat. Rev. Genet. 6(6): 488-501 (2005). Пациентов, страдающих гемофилией А, можно лечить путем вливаний очищенного или полученного с помощью рекомбинантных технологий Ф VIII. При этом все коммерчески доступные продукты, содержащие Ф VIII, как известно, имеют время полужизни, составляющее 8-12 ч, и требуют частых внутривенных введений пациентам. См. Weiner M.A. and Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lilliecap, D. Thromb. Res. 122 Suppl 4:S2-8 (2008). Помимо этого было предпринято большое количество попыток с целью продлить время полужизни Ф VIII. Например, подходы в разработках для продления времени полужизни факторов свертывания крови включают пэгилирование, гликопэгилирование и конъюгацию с альбумином. См. Dumontetal., Blood. 119(13): 3024-3030 (опубликовано онлайн 13 января 2012 г.). Независимо от используемой белковой инженерии разрабатываемые в последнее время содержащие Ф VIII продукты длительного действия обладают продленными временами полужизни, но эти времена полужизни, как сообщается, ограничены: на доклинических животных моделях было получено продление всего лишь в около 1,5-2 раза. См. Id. Схожие результаты были продемонстрированы для людей, например, сообщалось, что для пациентов, страдающих гемофилией А, время полужизни rFVIIIIFc продлено в ~1,7 раз по сравнению с ADVATE®. См. Id. Следовательно, продление времени полужизни, несмотря на небольшое увеличение, может указывать на присутствие других ограничивающих T1/2 факторов. See Liu, T. et al., 2007 ISTH meeting, abstract #P-M-035; Henrik, A. et al., 2011 ISTH meeting, abstract #P-MO-181; Liu, T. et al., 2011 ISTH meeting abstract #P-WE-131.

Плазменный фактор Виллебранда (ФВ) имеет время полужизни, составляющее приблизительно 12 ч (в диапазоне от 9 до 15 ч). http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm (последний визит 22 октября 2011 г.). На время полужизни ФВ может воздействовать большое количество факторов: профиль гликозилирования, ADAMTS-13 (дезинтегрин и металлопротеаза в сочетании с тромbosпондидном мотив-13), а также различные мутации в ФВ.

В плазме 95-98% Ф VIII циркулирует в тесном нековалентном комплексе с полноразмерным ФВ. Образование этого комплекса важно для поддержки соответствующих плазменных уровней Ф VIII in vivo. Lenting et al., Blood. 92(11): 3983-96 (1998); Lenting et al., J. Thromb. Haemost. 5(7): 1353-60 (2007). Полноразмерный Ф VIII дикого типа в основном находится в виде гетеродимера, содержащего тяжелую цепь (ММ 200 кДа) и легкую цепь (ММ 73 кДа). Когда Ф VIII активируется благодаря протеолизу на позициях 372 и 740 тяжелой цепи и на позиции 1689 легкой цепи, связанный с Ф VIII ФВ отделяется от активированного Ф VIII. Активированный Ф VIII вместе с активированным фактором IX, кальцием и фосфолипидом ("теназный комплекс") участвуют в активации фактора X, вырабатывая большие количества тромбина. Тромбин, в свою очередь, расщепляет фибриноген до образования растворимых мономеров фибрлина, которые затем спонтанно полимеризуются до образования растворимого фибринового полимера. Тромбин также активирует фактор XIII, который вместе с кальцием служит для перекрестного связывания и стабилизации растворимого фибринового полимера, образуя перекрестно-связанный (нерас растворимый) фибрин. Активированный Ф VIII быстро удаляется из циркуляции при помощи протеолиза.

Из-за частого дозирования и неудобств, связанных с режимом дозирования, до сих пор существует потребность в разработке продуктов, содержащих Ф VIII, которые требуют менее частого применения, т.е. содержащего Ф VIII продукта, который имеет время полужизни, превышающее ограничение в 1,5-2-кратное увеличение времени полужизни.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к химерному белку, содержащему белок фактора VIII ("Ф VIII") и дополнительный компонент ("ДК"), причем дополнительный компонент подавляет или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII. Белок Ф VIII и дополнительная группа связаны между собой ковалентной связью для того, чтобы предотвратить диссоциацию дополнительного компонента в присутствии эндогенного ФВ. В одном варианте реализации изобретения ковалентная связь представляет собой пептидную связь, дисульфидную связь или линкер, который является достаточно сильным для того, чтобы предотвратить диссоциацию дополнительного компонента от белка Ф VIII в присутствии эндогенного ФВ. В другом варианте реализации изобретения дополнительный компонент предотвращает выведение белка Ф VIII в процессе очистки ФВ. В других вариантах реализации изобретения дополнительный компонент подавляет или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII путем экранирования или блокирования ФВ-связывающего участка белка Ф VIII. Например, ФВ-связывающий участок находится в домене А3, или домене С2 белка Ф VIII, или в обоих - домене А3 и домене С2.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок включает конструкцию, содержащую белок Ф VIII и дополнительный компонент, которые связаны между собой ковалентной связью, при этом химерный белок не содержит фактор, ограничивающий время полужизни Ф VIII, который индуцирует ограничение времени полужизни белка Ф VIII, например полноразмерный белок ФВ или зрелый белок ФВ. Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения время полужизни белка Ф VIII химерного белка выходит за пределы ограничения по времени полужизни белка Ф VIII в присутствии эндогенного ФВ.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный компонент обладает по меньшей мере одним ФВ-подобным Ф VIII-защитным свойством. Примеры ФВ-подобного Ф VIII-защитного свойства включают, но не ограничиваются этим, защиту белка Ф VIII от одного или более расщеплений протеазой, защиту белка Ф VIII от активации, стабилизацию тяжелой цепи и/или легкой цепи белка Ф VIII или предотвращение выведения белка Ф VIII одним или более фагоцитарными рецепторами. В одном варианте реализации изобретения дополнительный компонент содержит полипептид, неполипептидный компонент или оба этих компонента. В другом варианте реализации изобретения дополнительный компонент может представлять собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 350, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 450, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 550, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 650, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 750, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 850, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 950 или по меньшей мере около 1000 аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения дополнительный компонент содержит фрагмент ФВ, константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент или любые комбинации этих компонентов. В других вариантах реализации изобретения дополнительный компонент представляет собой неполипептидный компонент, содержащий полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любые комбинации этих компонентов.

В определенных вариантах реализации изобретения дополнительный компонент содержит фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3 ФВ, при этом фрагмент ФВ связан с белком Ф VIII нековалентной связью в дополнение к ковалентной связи между белком Ф VIII и дополнительным компонентом (фрагментом ФВ). В одном примере фрагмент ФВ является мономером. В другом примере фрагмент ФВ содержит два, три, четыре, пять или шесть фрагментов ФВ, связанных друг с другом одной или более связями.

В одном аспекте реализации изобретения химерный белок содержит дополнительный компонент, например фрагмент ФВ, и по меньшей мере один гетерологичный компонент (Н1) и произвольный линкер между дополнительным компонентом, например фрагментом ФВ, и гетерологичным компонентом (Н1). В одном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) может содержать вещество, которое продлевает время полужизни белка Ф VIII, например полипептид, выбранный из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любых комбинаций этих компонентов, либо неполипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала

(ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) содержит первую Fc-область. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере около 50 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот, по меньшей мере около 250 аминокислот, по меньшей мере около 300 аминокислот, по меньшей мере около 350 аминокислот, по меньшей мере около 400 аминокислот, по меньшей мере около 450 аминокислот, по меньшей мере около 500 аминокислот, по меньшей мере около 550 аминокислот, по меньшей мере около 600 аминокислот, по меньшей мере около 650 аминокислот, по меньшей мере около 700 аминокислот, по меньшей мере около 750 аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 850 аминокислот, по меньшей мере около 900 аминокислот, по меньшей мере около 950 аминокислот или по меньшей мере около 1000 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит линкер между дополнительным компонентом, например фрагментом ФВ, и гетерологичным компонентом (Н1), который является отщепляемым линкером.

В другом аспекте реализации изобретения белок Ф VIII в химерном белке содержит Ф VIII и по меньшей мере один гетерологичный компонент (Н2). В одном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н2) способен продлевать время полужизни белка Ф VIII, например полипептида, выбранного из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любых комбинаций этих компонентов, либо неполипептидного компонента, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В конкретном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н2) содержит вторую Fc-область.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую фрагмент ФВ, первый гетерологичный компонент и линкер, и вторую полипептидную цепь, содержащую белок Ф VIII и второй гетерологичный компонент, при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны друг с другом ковалентной связью. В одном примере первый гетерологичный компонент и второй гетерологичный компонент связаны друг с другом ковалентной связью, например дисульфидной связью, пептидной связью или линкером, при этом ковалентная связь препятствует замещению фрагмента ФВ в первой полипептидной цепи эндогенным ФВ *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер между белком Ф VIII и вторым гетерологичным компонентом является отщепляемым линкером.

В определенных вариантах реализации изобретения первый гетерологичный компонент (Н1), связанный с фрагментом ФВ, и второй гетерологичный компонент (Н2), связанный с белком Ф VIII, связаны посредством линкера, например линкера оцFc, который является процессируемым линкером.

В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII химерного белка дополнительно содержит третий гетерологичный компонент (Н3), четвертый гетерологичный компонент (Н4), пятый гетерологичный компонент (Н5), шестой гетерологичный компонент (Н6) или любые их комбинации. В одном варианте реализации изобретения один или более из третьего гетерологичного компонента (Н3), четвертого гетерологичного компонента (Н4), пятого гетерологичного компонента (Н5), шестого гетерологичного компонента (Н6) способны продлевать время полужизни белка Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения третий гетерологичный компонент (Н3), четвертый гетерологичный компонент (Н4), пятый гетерологичный компонент (Н5) и шестой гетерологичный компонент (Н6) связаны с С-концом или N-концом Ф VIII либо вставлены между двумя аминокислотами Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения один или более из третьего гетерологичного компонента (Н3), четвертого гетерологичного компонента (Н4), пятого гетерологичного компонента (Н5) или шестого гетерологичного компонента (Н6) содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере около 50 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот, по меньшей мере около 250 аминокислот, по меньшей мере около 300 аминокислот, по меньшей мере около 350 аминокислот, по меньшей мере около 400 аминокислот, по меньшей мере около 450 аминокислот, по меньшей мере около 500 аминокислот, по меньшей мере около 550 аминокислот, по меньшей мере около 600 аминокислот, по меньшей мере около 650 аминокислот, по меньшей мере около 700 аминокислот, по меньшей мере около 750 аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 850 аминокислот, по меньшей мере около 900 аминокислот, по меньшей мере около 950 аминокислот или по меньшей мере около 1000 аминокислот.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер между белком Ф VIII и вторым гетерологичным компонентом или линкер между фрагментом ФВ и первым гетерологичным компонентом дополнительно содержит первый сайт расщепления (Р1) на N-концевом участке линкера, второй сайт расщепления (Р2) на С-концевом участке линкера, либо оба этих компонента. В других вариантах реализации изобретения один или более элементов из линкера между белком Ф VIII и дополнительным компонентом, линкера между белком Ф VIII и вторым гетерологичным компонентом и линкера между фрагментом ФВ и первым гетерологичным компонентом имеют длину от около 1 до около 2000 аминокислот.

В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит белок Ф VIII и дополнительный компонент, которые связаны посредством линкера между белком Ф VIII и дополнительным компонентом, при этом линкер дополнительно содержит распознающий сортазу мотив, например последовательность LPXTG (SEQ ID NO: 106).

Настоящее изобретение относится к фрагменту фактора Виллебранда (ФВ), содержащему домен D' и домен D3 ФВ, причем фрагмент ФВ связывается с фактором VIII (Ф VIII) и препятствует связыванию эндогенного ФВ с белком Ф VIII. В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ, являющийся объектом изобретения, не является аминокислотами от 764 до 1274 из SEQ ID NO: 2. В одном варианте реализации изобретения белок Ф VIII без фрагмента ФВ имеет время полужизни, сравнимое с Ф VIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения белок Ф VIII является слитым белком, содержащим Ф VIII и гетерологичный компонент, который способен продлевать время полужизни Ф VIII. Гетерологичный компонент может являться полипептидом, неполипептидным компонентом или обоими этими компонентами. Гетерологичный полипептидный компонент может быть выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любой комбинации этих компонентов. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный полипептидный компонент является константной областью иммуноглобулина или ее частью, например Fc-областью. В других вариантах реализации изобретения неполипептидный компонент выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения белок Ф VIII содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом первая полипептидная цепь содержит Ф VIII и первую Fc-область, а вторая полипептидная цепь содержит вторую Fc-область без Ф VIII.

В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ продлевает время полужизни Ф VIII. Аминокислотная последовательность домена D' может быть по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотам от 764 до 866 из SEQ ID NO: 2. Также аминокислотная последовательность домена D3 может быть по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотам от 867 до 1240 из SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в остатке, соответствующем остатку 1099, остатку 1142 либо им обоим из SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ содержит, состоит преимущественно из или состоит из аминокислот от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2. Фрагмент ФВ может дополнительно содержать домен D1, домен D2 или домены D1 и D2, принадлежащие ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ дополнительно содержит домен ФВ, выбранный из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена СК, одного или более их фрагментов и любых комбинаций этих компонентов. В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ является пэгилированным, гликопэгилированным, гэкилированным или полисиалированным.

Настоящее изобретение также относится к химерному белку, содержащему описанный в данном тексте фрагмент ФВ, гетерологичный компонент и произвольный линкер между фрагментом ФВ и гетерологичным компонентом. Гетерологичный компонент может являться полипептидом, неполипептидным компонентом или обоими этими компонентами. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный полипептидный компонент выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любой комбинации этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный неполипептидный компонент выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В конкретном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент представляет собой первую Fc-область. Химерный белок может дополнительно содержать вторую Fc-область, при этом вторая Fc-область связана или соединена с первой Fc-областью либо связана или соединена с фрагментом ФВ.

В одном аспекте химерный белок, являющийся объектом изобретения, содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из

- (аа) V-L1-H1-L2-H2,
- (бб) H2-L2-H1-L1-V,
- (вв) H1-L1-V-L2-H2 и
- (гг) H2-L2-V-L1-H1,

где V является одним или более из описанных в данном тексте фрагментов ФВ;

каждый из L1 и L2 является произвольным линкером;

H1 является первым гетерологичным компонентом;

(-) представляет пептидную связь либо одну или более аминокислот и

H2 является произвольным вторым гетерологичным компонентом.

В одном варианте реализации изобретения H1 является первым гетерологичным компонентом, на-

пример продлевающей время полужизни молекулой, известной в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент является полипептидом. Первый гетерологичный полипептидный компонент выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любых комбинаций этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения Н1 является неполипептидным компонентом, выбранным из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. Н2 является произвольным вторым гетерологичным компонентом, например продлевающей время полужизни молекулой, известной в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения второй гетерологичный компонент может быть выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любой комбинации этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения Н2 является неполипептидным компонентом, который выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения Н1 является первой Fc-областью, а Н2 является второй Fc-областью. Первая Fc-область и вторая Fc-область могут быть одинаковыми или различными и могут быть связаны друг с другом линкером или ковалентной связью, например дисульфидной связью. В другом варианте реализации изобретения вторая Fc-область связана или соединена с белком фактора VIII. В некоторых случаях может присутствовать третий гетерологичный компонент Н3, который продлевает время полужизни и который связан с фрагментом ФВ, первым гетерологичным компонентом или вторым гетерологичным компонентом. Неограничивающие примеры третьего гетерологичного компонента могут включать полипептидный или неполипептидный компоненты либо оба эти компонента. В одном варианте реализации изобретения третий гетерологичный компонент может быть выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента или любых комбинаций этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения Н2 является неполипептидным компонентом, который может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения Н3 связан с фрагментом ФВ или первым либо вторым гетерологичным компонентом посредством отщепляемого линкера, например тромбин-отщепляемым линкером. Неограничивающие примеры линкеров приведены в другом месте данного текста.

В другом аспекте изобретения предложен химерный белок, содержащий описанный в данном тексте фрагмент ФВ, белок Ф VIII и произвольный линкер между фрагментом ФВ и белком Ф VIII. Фрагмент ФВ может быть связан с белком Ф VIII. В одном варианте реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ, который связан с гетерологичным компонентом. Гетерологичный компонент может являться компонентом, который продлевает время жизни белка, который содержит полипептид, неполипептидный компонент или оба эти компонента. Примеры такого гетерологичного полипептида включают, например, константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент или любые комбинации этих компонентов. Примеры неполипептидного компонента включают, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любые комбинации этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный компонент является первой Fc-областью, связанной с фрагментом ФВ. В других вариантах реализации изобретения химерный белок дополнительно содержит вторую Fc-область, связанную с белком Ф VIII. Фрагмент ФВ или белок Ф VIII могут быть связаны с первой Fc-областью или второй Fc-областью, соответственно, посредством линкера. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ, связанный с первым гетерологичным компонентом, например с первой Fc-областью, и белок Ф VIII, связанный со вторым гетерологичным компонентом, например с второй Fc-областью, при этом фрагмент ФВ дополнительно связан со вторым гетерологичным компонентом (например, второй Fc-областью) или белком Ф VIII посредством линкера или ковалентной связью либо первый гетерологичный компонент (например, Fc-область) дополнительно связан с белком Ф VIII или вторым гетерологичным компонентом (например, второй Fc-областью) посредством линкера или ковалентной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Ф VIII химерного белка содержит частичный В-домен. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Ф VIII с неполным В-доменом является Ф VIII 198 (SEQ ID NO: 105). В других вариантах реализации изобретения химерный белок дополнительно содержит распознающий сортаzu мотив.

В некоторых вариантах реализации результатом изобретения является продление времени полужизни белка Ф VIII по сравнению с белком Ф VIII без фрагмента ФВ или Ф VIII дикого типа. Время полужизни белка Ф VIII по меньшей мере в 1,5 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раз,

по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 11 раз или по меньшей мере в 12 раз больше, чем время полужизни белка Ф VIII без фрагмента ФВ. В одном варианте реализации изобретения время полужизни Ф VIII приблизительно 1,5-20-кратно, приблизительно 1,5-15-кратно или приблизительно 1,5-10-кратно превышает время полужизни Ф VIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения время полужизни Ф VIII продлено от около 2 до около 10 раз, от около 2 до около 9 раз, от около 2 до около 8 раз, от около 2 до около 7 раз, от около 2 до около 6 раз, от около 2 до около 5 раз, от около 2 до около 4 раз, от около 2 до около 3 раз, от около 2,5 до около 10 раз, от около 2,5 до около 9 раз, от около 2,5 до около 8 раз, от около 2,5 до около 7 раз, от около 2,5 до около 6 раз, от около 2,5 до около 5 раз, от около 2,5 до около 4 раз, от около 2,5 до около 3 раз, от около 3 до около 10 раз, от около 3 до около 9 раз, от около 3 до около 8 раз, от около 3 до около 7 раз, от около 3 до около 6 раз, от около 3 до около 5 раз, от около 3 до около 4 раз, от около 4 до около 6 раз, от около 5 до около 7 раз или от около 6 до около 8 раз по сравнению с Ф VIII дикого типа или белком Ф VIII без фрагмента ФВ. В других вариантах реализации изобретения время полужизни Ф VIII составляет 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 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч. В других вариантах реализации изобретения время полужизни Ф VIII составляет от около 15 ч до около двух недель, от около 16 ч до около одной недели, от около 17 ч до около одной недели, от около 18 ч до около одной недели, от около 19 ч до около одной недели, от около 20 ч до около одной недели, от около 21 ч до около одной недели, от около 22 ч до около одной недели, от около 23 ч до около одной недели, от около 24 ч до около одной недели, от около 36 ч до около одной недели, от около 48 ч до около одной недели, от около 60 ч до около одной недели, от около 24 ч до около шести дней, от около 24 ч до около пяти дней, от около 24 ч до около четырех дней, от около 24 ч до около трех дней или от около 24 ч до около двух дней.

В некоторых вариантах реализации изобретения среднее время полужизни Ф VIII у пациента составляет около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24 ч (1 дня), около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 40, около 44, около 48 ч (2 дней), около 54, около 60, около 72 ч (3 дней), около 84, около 96 ч (4 дней), около 108, около 120 ч (5 дней), около шести дней, около семи дней (одной недели), около восьми дней, около девяти дней, около 10 дней, около 11 дней, около 12 дней, около 13 дней или около 14 дней.

В другом аспекте химерный белок, являющийся объектом изобретения, содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из

- (a) V-L1-H1-L3-C-L2-H2,
 - (b) H2-L2-C-L3-H1-L1-V,
 - (c) C-L2-H2-L3-V-L1-H1,
 - (d) H1-L1-V-L3-H2-L2-C,
 - (e) H1-L1-V-L3-C-L2-H2,
 - (f) H2-L2-C-L3-V-L1-H1,
 - (g) V-L1-H1-L3-H2-L2-C,
 - (h) C-L2-H2-L3-H1-L1-V,
 - (i) H2-L3-H1-L1-V-L2-C,
 - (j) C-L2-V-L1-H1-L3-H2,
 - (k) V-L2-C-L1-H1-L3-H2 ی,
 - (l) H2-L3-H1-L1-C-L2-V,

где V является описанным в данном тексте фрагментом ΦB ;

каждый из L1 или L2 является произвольным линкером, например тромбин-отщепляемым линкером;

L3 является произвольным линкером, например oqFc линкером, например, процессируемым линкером;

каждый из H_1 или H_2 является произвольным гетерологичным компонентом;

С является белком Ф VIII и

(-) представляет пептидную связь либо одну или более аминокислот.

В других аспектах химерный белок, являющийся объектом изобретения, содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из

- (m) V-L1-H1:H2-L2-C,
 - (n) V-L1-H1:C-L2-H2,

- (o) H1-L1-V:H2-L2-C,
- (p) H1-L1-V:C-L2-H2,
- (q) V:C-L1-H1:H2,
- (r) V:H1-L1-C:H2,
- (s) H2:H1-L1-C:V,
- (t) C:V-L1-H1:H2 и
- (u) C:H1-L1-V:H2,

где V является описанным в данном тексте фрагментом ФВ;

каждый из L1 или L2 является произвольным линкером, например тромбин-отщепляемым линкером;

каждый из H1 или H2 является произвольным гетерологичным компонентом;

С является белком Ф VIII;

(-) представляет пептидную связь либо одну или более аминокислот и

(:) представляет химическое или физическое соединение между H1 и H2, между V и C, и между V и H1 и С и H2. (:) представляет собой химическое соединение, например по меньшей мере одну непептидную связь. В определенных вариантах реализации изобретения химическое соединение, т.е. (:), является ковалентной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение между H1 и H2 является ковалентной связью, например дисульфидной связью. В других вариантах реализации изобретения соединение, т.е. (:), является нековалентным взаимодействием, например ионным взаимодействием, гидрофобным взаимодействием, гидрофильным взаимодействием, Ван-дер-Ваальсовским взаимодействием, водородной связью. В определенных вариантах реализации изобретения соединение между белком Ф VIII и фрагментом ФВ является нековалентной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) является непептидной ковалентной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) является пептидной связью. В одном варианте реализации изобретения H1 является первым гетерологичным компонентом. В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент способен продлевать время полужизни активности Ф VIII. В другом варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент является полипептидом, неполипептидным компонентом или обеими этими компонентами. В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент может быть выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любых комбинаций этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения неполипептидный компонент выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксизтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения H2 является вторым гетерологичным компонентом. Второй гетерологичный компонент также может являться известным в данной области техники веществом, продлевающим время полужизни, и являться полипептидным, неполипептидным компонентом или обеими этими компонентами. В одном варианте реализации изобретения второй гетерологичный компонент выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента и любых комбинаций этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения неполипептидный компонент выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксизтилового крахмала (ГЭК), их производных и любых комбинаций этих компонентов. В конкретном варианте реализации изобретения H1 является первой Fc-областью. В некоторых вариантах реализации изобретения H2 является второй Fc-областью. В некоторых случаях может присутствовать третий гетерологичный компонент H3, который продлевает время полужизни. H3 может быть связан с одним или более элементом из V, С, H1 или H2 посредством произвольного линкера, например отщепляемого линкера, например тромбин-отщепляемого линкера. Неограничивающие примеры третьего гетерологичного компонента могут включать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (ПЭГ), последовательность PAS, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК) или их производные.

В определенных вариантах реализации изобретения один или более из линкеров, применяемых для соединения друг с другом фрагмента ФВ, белка Ф VIII, первого гетерологичного компонента и/или второго гетерологичного компонента, соответствующих формулам от (a) до (u), является отщепляемым линкером. Один или более из сайтов расщепления химерного белка могут отщепляться протеазой, выбранной из группы, состоящей из фактора XIa, фактора XPa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора Pa (тромбина), эластазы-2, гранзима B, ВГГ, энтерокиназы, протеазы 3C, сортазы A, ММП-12, ММП-13, ММП-17 и ММП-20. В других вариантах реализации изобретения один или более линкеров, применяемых в формулах от (a) до (l) (например, L3), содержат процессируемый линкер. Процессируемые линкеры могут отщепляться внутриклеточным ферментом непосредственно после секреции. Процессируемый линкер может содержать первый сайт расщепления (P1) на N-концевом участке линкера, второй сайт расщепления (P2) на С-концевом участке линкера либо оба этих компонента.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более из линкеров, применяемых в изо-

бретении, имеют длину по меньшей мере от около 1 до около 2000 аминокислот. В определенном варианте реализации изобретения один или более из линкеров, применяемых в изобретении, имеют длину по меньшей мере около 20, 35, 42, 48, 73, 98, 144, 288, 324, 576 или 864 аминокислот. В конкретном варианте реализации изобретения один или более из линкеров содержат пептид gly/ser. Пептид gly/ser может представлять собой (Gly4 Ser)₃ или (Gly4 Ser)₄.

В других аспектах реализации изобретения белок Ф VIII в химерном белке является функциональным белком фактора VIII. Белок Ф VIII может содержать один или более доменов Ф VIII, выбранных из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена B, домена A3, домена C1, домена C2, одного или более их фрагментов и любых их комбинаций. В одном варианте реализации изобретения белок Ф VIII содержит B-домен или его часть. В другом варианте реализации изобретения белок Ф VIII является Ф VIII-SQ с удаленным B-доменом. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII содержит одиночную цепь Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII содержит тяжелую цепь Ф VIII и легкую цепь фактора VIII, при этом тяжелая цепь и легкая цепь соединены между собой металлической связью. В определенных вариантах реализации изобретения белок Ф VIII обладает низкой аффинностью к либо не связывается с белком, родственным рецептору липопротеинов низкой плотности (БРР). Например, белок Ф VIII, применяемый в изобретении, может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая снижает аффинность к или исключает связывание с БРР. Неограничивающими примерами по меньшей мере одной аминокислотной замены являются замены остатков полноразмерного зрелого Ф VIII, соответствующих остатку 471, остатку 484, остатку 487, остатку 490, остатку 497, остатку 2092, остатку 2093 либо двум или более их комбинациям. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Ф VIII в химерном белке, являющемся объектом данного изобретения, содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая обуславливает стабильность белка Ф VIII большую, чем у белка Ф VIII без замены. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII содержит по меньшей мере две аминокислотных замены в домене A2 и по меньшей мере одну аминокислотную замену в домене A3, при этом домен A2 и домен A3 соединены между собой ковалентной связью. Неограничивающими примерами аминокислотной замены в домене A2 являются замены остатков полноразмерного зрелого Ф VIII, соответствующих остатку 662 или 664. Вдобавок, неограничивающими примерами аминокислотной замены в домене A3 являются замены остатков полноразмерного зрелого полисиалированного Ф VIII, соответствующих остатку 1826 или 1828.

В дополнительных аспектах изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий описанный в данном тексте фрагмент ФВ или описанный в данном тексте химерный белок, либо группа полинуклеотидов, содержащая первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, при этом первая нуклеотидная цепь кодирует фрагмент ФВ, а вторая нуклеотидная цепь кодирует вторую Fc-область, или фактор свертывания крови, или его фрагмент, принадлежащие химерному белку. В одном варианте реализации изобретения группа полинуклеотидов дополнительно содержит третью полипептидную цепь, которая кодирует пропротеин конвертазу, которая принадлежит семейству субтилизинподобных пропротеин конвертаз. Неограничивающие примеры пробелка конвертазы включают пропротеин конвертазу субтилизин/кексин типа 3 (PACE или PCSK3), пропротеин конвертазу субтилизин/кексин типа 5 (PCSK5 или PC5), пропротеин конвертазу субтилизин/кексин типа 7 (PCSK7 или PC7) или дрожжевую протеазу Кех 2. В других аспектах изобретение включает вектор, содержащий полинуклеотид или группу полинуклеотидов и один или более промоторов, функционально связанных с полинуклеотидом или группой полинуклеотидов, либо группу векторов, содержащую первый вектор и второй вектор, при этом первый вектор кодирует первую полинуклеотидную цепь группы полинуклеотидов, а второй вектор кодирует вторую полинуклеотидную цепь группы полинуклеотидов. Группа векторов может дополнительно содержать третий вектор, который содержит третью полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор дополнительно содержит PACE. В некоторых вариантах реализации изобретения PACE отщепляет домены D1D2 фрагмента ФВ.

Некоторые аспекты изобретения относятся к фармацевтическому составу, содержащему фрагмент ФВ, химерный белок, полинуклеотид, группу полинуклеотидов, вектор или группу векторов и фармацевтически приемлемый носитель. Состав, являющийся объектом данного изобретения, может продлевать время полужизни фактора VIII. В других аспектах изобретение включает клетку-хозяин, содержащую полинуклеотид, группу полинуклеотидов, вектор или группы векторов.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к химерному белку, содержащему белок Ф VIII, дополнительный компонент и произвольный линкер, при этом дополнительный компонент подавляет или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII и обладает по меньшей мере одним ФВ-подобным Ф VIII-защитным свойством. ФВ-подобное Ф VIII-защитное свойство включает защиту белка Ф VIII от одного или более расщеплений протеазой, защиту белка Ф VIII от активации, стабилизацию тяжелой цепи и/или легкой цепи белка Ф VIII или предотвращение выведения белка Ф VIII одним или более фагоцитарными рецепторами.

Дополнительный компонент химерного белка может подавлять или предотвращать связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII путем защиты или блокирования ФВ-связывающего участка белка Ф VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения ФВ-связывающий участок находится в домене A3 или

домене С2 белка Ф VIII, или в обоих - домене А3 и домене С2 белка Ф VIII. В другом варианте реализации изобретения ФВ-связывающий участок представляет собой аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотам от 1669 до 1689 и от 2303 до 2332 из SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный компонент является полипептидным, неполипептидным компонентом или обоими этими компонентами. Полипептид, применяемый в качестве дополнительного компонента, может содержать аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 аминокислот. Например, полипептид, применяемый в качестве дополнительного компонента, может быть выбран из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части, альбумина или его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, последовательности PAS, последовательности НАР, других продлевающих время полужизни соединений и любых комбинаций этих компонентов. Неполипептидный компонент, применяемый в качестве дополнительного компонента, может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полисиаловой кислоты, гидроксиэтилового крахмала (ГЭК) или их производных и любых комбинаций этих компонентов. В одном варианте реализации изобретения дополнительный компонент является описанным в данном тексте фрагментом ФВ. Дополнительный компонент и белок Ф VIII могут быть связанными, например, посредством линкера, или соединенными друг с другом. Линкер может содержать отщепляемый линкер, например тромбин-отщепляемый линкер.

В одном аспекте изобретения предложен способ предотвращения или подавления связывания белка Ф VIII с эндогенным ФВ, включающий введение эффективного количества фрагмента ФВ, химерного белка, полинуклеотида или группы полинуклеотидов в клетку, содержащую белок Ф VIII или полинуклеотид, кодирующий белок Ф VIII, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII. В другом аспекте изобретение включает способ предотвращения или подавления связывания белка Ф VIII с эндогенным ФВ, включающий введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотида или группы полинуклеотидов нуждающемуся в этом пациенту, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII и тем самым предотвращает или подавляет связывание белка Ф VIII. В некоторых аспектах изобретение включает способ продления или увеличения времени полужизни белка Ф VIII, при этом способ включает введение эффективного количества фрагмента ФВ, химерного белка, полинуклеотида или группы полинуклеотидов в клетку, содержащую белок Ф VIII или полинуклеотид, кодирующий белок Ф VIII, или нуждающемуся в этом пациенту, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII. Другие аспекты изобретения относятся к способу предотвращения или подавления выведения белка Ф VIII из клетки, при этом способ включает введение эффективного количества фрагмента ФВ, химерного белка, полинуклеотида или группы полинуклеотидов в клетку, содержащую белок Ф VIII или полинуклеотид, кодирующий белок Ф VIII, или нуждающемуся в этом пациенту, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII.

Другой аспект изобретения относится к способу лечения заболевания или нарушения, связанного с кровотечением, у нуждающегося в этом пациенте, включающему введение эффективного количества фрагмента ФВ, химерного белка, полинуклеотида или группы полинуклеотидов, при этом заболевание или нарушение, связанное с кровотечением, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, кровоизлияния в брюшную полость, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В других вариантах реализации изобретения лечение является профилактическим или осуществляется по требованию. В других вариантах реализации изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения, связанного с болезнью Виллебранда типа 2N, у нуждающегося в этом пациенте, включающий введение эффективного количества фрагмента ФВ, химерного белка, полинуклеотида или группы полинуклеотидов, при этом заболевание или нарушение излечивается.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А-Е - схематические изображения белков ФВ. На фиг. 1А показаны два фрагмента ФВ, содержащие аминокислоты от 1 до 276 из SEQ ID NO: 73 (аминокислоты от 764 до 1039 из SEQ ID NO: 2). ФВ-001 синтезирован без пре/пропептидных последовательностей ФВ, а ФВ-009 синтезирован с пре/пропептидными последовательностями (домены D1 и D2). Препептид ФВ-009 отщепляется во время синтеза, а ФВ-009 содержит пропептид с последовательностями доменов D' и D3. На фиг. 1Б показаны три фрагмента ФВ, содержащие аминокислоты от 1 до 477 из SEQ ID NO: 73 (аминокислоты от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2). ФВ-002 синтезирован без пре/пропептидных последовательностей. ФВ-010 содержит домены D1D2 дополнительно к доменам D'D3. ФВ-013 содержит домены D1D2D'D3 дополнительно к остаткам аланина, замещающим цистеин в остатках 336 и 379 из SEQ ID NO: 72. На фиг. 1В показаны два фрагмента ФВ, содержащие домены D'D3 и часть домена А1. ФВ-003 содержит аминокислоты от 764 до 1274 из SEQ ID NO: 2. ФВ-011 содержит домены D1D2 дополнительно к доменам D'D3. На фиг. 1Г показаны две конструкции - ФВ-004 и ФВ-012. ФВ-004 содержит домены D'D3 и полную последовательность домена А1. ФВ-012 содержит домены D1D2D'D3 и полную последовательность домена

A1. На фиг. 1Д показаны три конструкции. ФВ-006 содержит домены D1D2D'D3 и домен СК ФВ (цистеиновый узловый домен - от англ. "cysteine knot domain"). ФВ-008 является полноразмерным ФВ. ФВ-031 (ФВ-Fc) демонстрирует конструкцию, содержащую домены D1D2D'D3, связанные с одиночной Fc-областью посредством отщепляемого линкера. ФВ-053 представляет собой домены D1D2. На фиг. 1Е показан полноразмерный белок ФВ, содержащий пропептид (домены D1 и D2) и зрелые субъединицы (домены D', D3, A1, A2, A3, D4, B1-3, C1-2). Белок ФВ является белком в около 250 кДа и образует мультимеры (>20 МДа) путем дисульфидного связывания. Белок ФВ объединяется с Ф VIII (95-98%) в нековалентный комплекс и далее продлевает время полужизни Ф VIII, защищая Ф VIII от отщепления протеазой/активации, стабилизируя тяжелую и легкую цепь и предотвращая очищение от Ф VIII фагоцитарными рецепторами. Белок ФВ также может ограничивать время полужизни Ф VIII путем очищения комплекса Ф VIII-ФВ при помощи рецепторов ФВ и предотвращая пиноцитоз и рециклинг рФ VIIIIFc.

Фиг. 2 - схематические изображения примеров конструкций гетеродимеров ФВ:Ф VIII. Левая конструкция демонстрирует фрагмент ФВ, содержащий домены D'D3 полноразмерного ФВ (аминокислоты 1-477 из SEQ ID NO: 73) и содержащий замены аланина в остатках 336 и 379 из SEQ ID NO: 72. Конструкция химерного белка (Ф VIII 064/065) содержит С-конец фрагмента ФВ, связанный с первой Fc-областью посредством линкера, а Ф VIII связан со второй Fc-областью, при этом вторая Fc-область дополнительно связана с N-концом фрагмента ФВ посредством линкера (например, формула С-H1-L1-V-L2-H2, в которой V является фрагментом ФВ, С является Ф VIII, H1 и H2 являются Fc-областями, а L1 и L2 являются отщепляемыми линкерами). Конструкция на фиг. 2Б является внутриклеточно процессированной конструкцией гетеродимера ФВ:Ф VIII, в которой был отщеплен линкер между второй Fc-областью и N-концом фрагмента ФВ. Ф VIII-064 содержит домены D'D3 ФВ (аминокислоты от 1 до 477 из SEQ ID NO: 73 с заменами C336A и C379). Ф VIII-065 содержит домены D'D3 ФВ (аминокислоты от 1 до 276 из SEQ ID NO: 73). Ф VIII-136 содержит Ф VIIIIFc, связанную с Fc-фрагментом D'D3 посредством линкера, который может процессировать внутриклеточный протеазный фермент. Когда экспрессируется Ф VIII-136, фермент отщепляет линкер между второй Fc-областью (соединеной с Ф VIII-ЛЦ) и D'D3 фрагментом ФВ (соединененным с первой Fc-областью), в то время как Fc-область, соединенная с (или связанная с) Ф VIII-ЛЦ образует ковалентную связь (например, дисульфидную связь) с первой Fc-областью, соединенной с (или связанной с) фрагментом ФВ. Ф VIII-148 является одноцепочечным Ф VIIIIFc с фрагментом D'D3 (одноцепочечный Ф VIII, получен путем внесения мутации R1645A/R1648A в ген Ф VIII).

Фиг. 3 - схематические изображения примеров конструкций гетеродимеров ФВ:Ф VIII, содержащие примеры переменных линкеров между ФВ и Fc-областью. Конструкции (Ф VIII-064, Ф VIII-159, Ф VIII-160, Ф VIII-178 и Ф VIII-179) имеют общую структуру, представленную формулой С-H1-L1-V-L2-H2, но содержат в качестве примеров различные линкеры или аминокислотные замены. Показанные конструкции содержат одинаковый фрагмент ФВ, который представляет собой домены D' и D3 ФВ (т.е. аминокислоты от 1 до 477 из SEQ ID NO: 73 с аминокислотными заменами C336A и C379). Конструкция Ф VIII-64 содержит тромбин-отщепляемый линкер (т.е. L2) между фрагментом ФВ и Fc-областью (т.е. H2), который содержит 20 аминокислот. Конструкция Ф VIII-159 содержит тромбин-отщепляемый линкер (т.е. L2) между фрагментом ФВ и Fc-областью (т.е. H2), который содержит 35 аминокислот. Конструкция Ф VIII-160 содержит тромбин-отщепляемый линкер (т.е. L2) между фрагментом ФВ и Fc-областью (т.е. H2), который содержит 48 аминокислот. Конструкции Ф VIII-180, Ф VIII-181 и Ф VIII-182 являются производными Ф VIII-160, содержащими мутацию K2092A в домене C1 Ф VIII, мутацию K2093A в домене C1 Ф VIII и мутации K2092A/K2093A в домене C1 Ф VIII соответственно. Конструкция Ф VIII-178 содержит тромбин-отщепляемый линкер (т.е. L2) между фрагментом ФВ и Fc-областью (т.е. H2), который содержит 73 аминокислоты. Конструкция Ф VIII-179 содержит тромбин-отщепляемый линкер (т.е. L2) между фрагментом ФВ и Fc-областью (т.е. H2), который содержит 98 аминокислот.

Фиг. 4 - схематические изображения примеров конструкций Ф VIII-ФВ, в которых ФВ является D1D2D'D3 фрагментом ФВ, линкер является линкером переменной длины, содержащим сайт расщепления, например сайт расщепления тромбина, ОЦ Ф VIII является одноцепочечным Ф VIII, который содержит замены R1645A/R1648A, Н является гетерологичным компонентом, например константной областью иммуноглобулина или ее частью, компонентом для конъюгации полиэтиленгликоля (ПЭГ) и/или ПЭГ, альбумином или фрагментом альбумина, альбуминсвязывающим веществом, последовательностью НАР, компонентом для полисиалирования и/или полисиаловой кислотой, компонентом для гидроксиэтилового крахмала (ГЭК) и/или ГЭК или последовательностью PAS и т.д., ТЦ Ф VIII является тяжелой цепью Ф VIII, ЛЦ Ф VIII является легкой цепью Ф VIII, а Fc является Fc-областью константной области иммуноглобулина. На фиг. 4А приведена формула ФВ-линкер-ОЦ Ф VIII. На фиг. 4Б приведена формула ФВ-линкер-Н-линкер-ОЦ Ф VIII. Линкеры (первый линкер между ФВ и Н и второй линкер между Н и ОЦ Ф VIII) могут быть одинаковыми или разными. На фиг. 4В приведена формула ФВ-линкер-ОЦ Ф VIII-линкер-Н. Линкеры (первый линкер между ФВ и ОЦ Ф VIII и второй линкер между ОЦ Ф VIII и Н) могут быть одинаковыми или разными. На фиг. 4Г приведена формула ФВ-линкер-ТЦ Ф VIII-Н-линкер-ЛЦ Ф VIII. Линкеры (первый линкер между ФВ и ТЦ Ф VIII и второй линкер между Н и ЛЦ Ф VIII) могут быть одинаковыми или разными. На фиг. 4Д приведена формула ТЦ Ф VIII-Н-ЛЦ Ф VIII-линкер-первая

Fc-линкер-ФВ-линкер-вторая Fc. Линкеры (первый линкер между ЛЦ Ф VIII и первой Fc-областью, второй линкер между первой Fc-областью и ФВ и третий линкер между ФВ и второй Fc-областью) могут быть одинаковыми или разными. Линкеры могут являться отщепляемыми линкерами. Например, линкер между первой Fc-областью и ФВ может являться отщепляемым линкером, содержащим сайт расщепления на N-конце и/или C-конце линкера. Первая Fc-область и вторая Fc-область могут быть одинаковыми или разными. На фиг. 4Е приведена формула ТЦ Ф VIII-Н-ЛС Ф VIII-линкер-первая Fc-линкер-ФВ-линкер-вторая Fc. Линкеры (первый линкер между ЛЦ Ф VIII и первой Fc-областью, второй линкер между первой Fc-областью и ФВ и третий линкер между ФВ и второй Fc-областью) могут быть одинаковыми или разными. Одни или более линкеров могут являться отщепляемыми линкерами. Например, линкер между первой Fc-областью и ФВ может являться отщепляемым линкером, содержащим сайт расщепления на N-конце и/или C-конце линкера. Первая Fc-область и вторая Fc-область могут быть одинаковыми или разными. На фиг. 4Ж приведена формула ОЦ Ф VIII-линкер-Fc-линкер-ФВ-Н-линкер-Fc. На фиг. 4З приведена формула пэгилированной или гэкилизированной ОЦ Ф VIII-линкер-Fc-линкер-ФВ-Н-линкер-Fc. Линкеры (первый линкер между ОЦ Ф VIII и первой Fc-областью, второй линкер между первой Fc-областью и ФВ и третий линкер между Н и второй Fc-областью) могут быть одинаковыми или разными. Одни или более линкеров могут являться отщепляемыми линкерами. Например, линкер между первой Fc-областью и ФВ может являться отщепляемым линкером, содержащим сайт расщепления на N-конце и/или C-конце линкера. Первая Fc-область и вторая Fc-область могут быть одинаковыми или разными.

Фиг. 5 - схематические изображения системы совместной трансфекции гетеродимеров Ф VIII-ФВ. Конструкция Ф VIII-155 содержит полноразмерную последовательность Ф VIII (с замещением остатком аланина остатков аргинина в позициях 1645 и 1648), связанную с Fc-областью. ФВ-031 содержит фрагмент D1D2D'D3 (с замещением остатком аланина остатков цистеина в позициях 336 и 379), который связан с другой Fc-областью посредством 48 тромбин-отщепляемым линкером. После внутриклеточного процессирования конструкция Ф VIII-155 продуцирует полноразмерный одноцепочный Ф VIII (ОЦФ VIII), соединенный с одним Fc-фрагментом, конструкция ФВ-031 продуцирует фрагмент D'D3 длиной в 477 аминокислот, связанный с другим Fc-фрагментом. Две ковалентные связи могут образовываться между Fc-фрагментами, которые связаны с ОЦ Ф VIII или фрагментом D'D3, что, в свою очередь, делает возможной ковалентное соединение Ф VIII и D'D3, которое является основной характеристикой требуемого конечного продукта.

Фиг. 6 иллюстрирует невосстановительный и восстановительный ДСН-ПААГ ФВ-009 (D1D2D'D3 аминокислоты 1-276×6 his), который показывает, что ФВ-009 существует в виде мономера. Непроцессированный обозначает ФВ-009 с пропептидом (домены D1D2).

Фиг. 7 иллюстрирует невосстановительный и восстановительный ДСН-ПААГ ФВ-002 (D'D3 аминокислоты 1-447×6 his) или ФВ-010 (D1D2D'D3 аминокислоты 1-447×6 his), который показывает, что ФВ-002 существует в виде мономера, а ФВ-010 существует в виде димера.

Фиг. 8 - расщепление тромбином гетеродимера Ф VIII-ФВ, приведенного на фиг. 2б. На дорожке 1 показан маркер. Дорожка 2 соответствует рФ VIII-Fc без тромбина. Дорожка 3 соответствует рФ VIII-Fc с тромбином. Дорожка 5 соответствует Ф VIIIIFc-ФВ. Дорожка 6 соответствует Ф VIIIIFc-ФВ и тромбину. A1 обозначает домен A1 Ф VIII, A2 обозначает домен A2 Ф VIII, а Δa3 ЛЦ обозначает легкую цепь Ф VIII.

Фиг. 9А-Б - активность Ф VIII, определенная при помощи хромогенного анализа Ф VIII. На фиг. 9А показан фармакокинетический профиль рФ VIII и рФ VIIIIFc для мышей с гемофилией А. На фиг. 9Б показан ФК профиль рФ VIII и рФ VIIIIFc для мышей с двойным Ф VIII/ФВ генным нокаутом (ДГН). На оси Y показана активность Ф VIII в мМЕ/мл, а на оси X показано время.

Фиг. 10А-Б - защита Ф VIII фрагментами D'D3, что отражает уровень мФ VIII в плазме (мМЕ/мл) и уровень экспрессии ФВ (нМ/мл) через 48 ч после плазмидной инъекции. Фрагментами ФВ, применяемыми для демонстрации защиты Ф VIII, являются ФВ-001 (276 ак, мономер), ФВ-009 (276 ак, мономер), ФВ-002 (477 ак, мономер), ФВ-010 (477 ак, димер), ФВ-003 (511 ак, мономер), ФВ-011 (511 ак, димер), ФВ-004 (716 ак, мономер), ФВ-012 (716 ак, димер), ФВ-006 и ФВ-008.

Фиг. 11 - фармакокинетический профиль рУВД-Ф VIII для Ф VIII-ФВ ДГН мышей при совместном применении с фрагментами D'D3. На фиг. 11А показана активность Ф VIII (мМЕ/мл), определенная при помощи хромогенного анализа Ф VIII, после совместного применения рУВД-Ф VIII и ФВ-002, или рУВД-Ф VIII и ФВ-010, или одного рУВД-Ф VIII к Ф VIII/ФВ ДГН мышам. На фиг. 11Б показан уровень ФВ-002 и ФВ-010 в плазме (нг/мл) после применения. Ось X отображает время в часах.

Фиг. 12 - фармакокинетический профиль рФ VIIIIFc для мышей, экспрессирующих D'D3 ФВ. На фиг. 12А показана последовательность гидродинамической инъекции (ГДИ) плазмидной ДНК, кодирующей домен D'D3 (день -5), внутривенного дозирования рФ VIIIIFc (день 0) и забора образца ФК (день 0 - день 3). На фиг. 12Б показана активность плазменного Ф VIII (мМЕ/мл) после инфузии рФ VIIIIFc, определенная при помощи хромогенного анализа для Ф VIII/ФВ ДГН мышей, которым проводили ГДИ доменов D1D2D'D3 (477ак) (кружки) и доменов D1D2D'D3 (477 ак) с цистеиновыми заменами (прямоугольники). Активность Ф VIII для контрольных мышей без ГДИ доменов D'D3 показана в виде треугольни-

ков. На фиг. 12В показан уровень D'D3 в плазме (нг/мл) после применения ГДИ D1D2D'D3 димерной или D1D2D'D3 мономерной конструкции ДНК. Ось X отображает время в часах.

Фиг. 13 - подборка линкеров D'D3-Fc по ГДИ для Ф VIII/ФВ ДГН мышей. Между доменами D'D3 и Fc-областью были вставлены линкеры различной длины (20 ак (Ф VIII-064), 35 ак (Ф VIII-159) или 48 ак (Ф VIII-160)). Активности Ф VIII (мМЕ/мл) определяли при помощи хромогенного анализа после ГДИ для Ф VIII/ФВ ДГН мышей.

Фиг. 14 - ГДИ одноцепочечного гетеродимера Ф VIIIIFc/D'D3 Ф VIII/ФВ ДГН мышам. Активности Ф VIII процессированного (двуихцепочечного) рФ VIIIIFc-D'D3 (пSYN-Ф VIII-136) и одноцепочечного рФ VIIIIFc-D'D3 (пSYN-Ф VIII-148) определяли через 24 и 48 ч после ГДИ.

Фиг. 15 - аффинность связывания гетеродимера Ф VIII-155/ФВ-031 с обездвиженным чФВ, определенная при помощи платформы Octet. Ф VIIIIFc, Ф VIII и IgG также использовали в качестве контроля. На оси x показано время в часах, а на оси у показано связывание в нанометрах (нм).

Фиг. 16 - фармакокинетика Ф VIII-155/ФВ-031 для мышей с дефицитом Ф VIII/ФВ (Ф VIII/ФВ ДГН). На оси x показано время в часах, а на оси у показано восстановление Ф VIII относительно исходного уровня в процентах.

Фиг. 17 - схематические изображения примеров конструкций фрагментов ФВ, в которых ФВ является D1D2D'D3 фрагментом ФВ; линкер является линкером переменной длины, содержащим сайт расщепления, например сайт расщепления тромбином; Н является гетерологичным компонентом, например константной областью иммуноглобулина или ее частью, компонентом для конъюгации полиэтиленгликоля (ПЭГ) и/или ПЭГ, альбумином или фрагментом альбумина, альбуминсвязывающим веществом, последовательностью НАР, компонентом для полисиалирования и/или полисиалиевой кислотой, компонентом для гидроксиэтилового крахмала (ГЭК) и/или ГЭК или последовательностью PAS и т.д.; и Fc является Fc-областью иммуноглобулина. На фиг. 17А приведена формула D1D2-D'-составляющей D3-N-составляющая D3-линкер-Fc. На фиг. 17Б приведена формула D1D2-составляющей D'-N-составляющая D'D3-линкер-Fc. На фиг 17В приведена формула D1D2-пэгилированной или гэкилизированной D'D3-линкер-Fc. В некоторых случаях линкер может быть отщеплен.

Фиг. 18 А) - потеря со временем Ф VIII-активности Ф VIIIIFc как в гемА-плазме (ромбы), так и в ДГН-плазме (квадраты). Активность Ф VIII определена при помощи хромогенного анализа. На оси x показано время в часах, а на оси у показана относительная активность. Б) показано, что потеря Ф VIII-активности происходит из-за диссоциации или деградации тяжелой цепи (ТЦ). На левой панели показан иммунопрепарационный анализ, в котором использовалось овечье поликлональное антитело к Ф VIII в Bio-rad 4-15% геле. Гель был гидрирован и визуализирован при помощи системы Bio-rad. На дорожке 1 показан неокрашенный маркер Bio-rad; на дорожке 2 показаны Ф VIIIIFc и ФБР; на дорожке 3 показаны Ф VIIIIFc и ДГН-плазма; и на дорожке 5 показано одно овечье поликлональное антитело к Ф VIII. На правой панели показан вестерн-блоттинг геля, в котором использовалось антитело к тяжелой цепи Ф VIII (GMA012). На дорожке 1 показан неокрашенный маркер Bio-rad; на дорожке 2 показаны Ф VIIIIFc и ФБР; на дорожке 3 показаны Ф VIIIIFc и ДГН-плазма; и на дорожке 4 показано одно овечье поликлональное антитело к Ф VIII.

Фиг. 19 - Ф VIII-активность как функция времени для Ф VIIIIFc дикого типа (кружки), оцФ VIIIIFc (одноцепочечного Ф VIII) (закрашенные треугольники) или гетеродимеров Ф VIII:ФВ (например, Ф VIII-155/ФВ-031) (пустые треугольники), определенная при помощи хромогенного анализа в плазме ДГН мышей (левая панель) и плазме гемА мышей (правая панель). На оси Y показана относительная активность Ф VIII. Ф VIIIIFc дикого типа содержит двойную цепь Ф VIII (т.е. тяжелую цепь Ф VIII и легкую цепь Ф VIII, которые удерживаются вместе нековалентной связью) и, таким образом, имеет три цепи - тяжелую цепь Ф VIII, легкую цепь Ф VIII, сшитую с Fc, и саму Fc-область. ОцФ VIIIIFc содержит одиночную цепь Ф VIII и, таким образом, имеет две цепи, одну, в которой одиночная цепь Ф VIII сшита с Fc, и другую, содержащую только Fc. Гетеродимер Ф VIII:ФВ (например, Ф VIII-155/ФВ-031) содержит одиночную цепь Ф VIII, сшитую с Fc, и фрагмент ФВ (D'D3), сшитый с Fc.

Фиг. 20 - процессинг домена D1D2, принадлежащего фрагменту ФВ (например, ФВ-031(D1D2D'D3Fc)), при помощи PC5 или PACE (фурина) различных концентраций. Процессинг D1D2 показан в Bio-rad 4-15% геле в восстановительных условиях при помощи устройства для визуализации Bio-rad. На дорожке 1 показан один ФВ-031; на дорожке 2 показан один PC5; на дорожке 3 показан один PACE; на дорожке 4 показаны ФВ-031 и PC5 при 2,5%; на дорожке 5 показаны ФВ-031 и PC5 при 5%; на дорожке 6 показаны ФВ-031 и PC5 при 7,5%; на дорожке 7 показаны ФВ-031 и PC5 при 10%; на дорожке 8 показаны ФВ-031 и PACE при 2,5%; на дорожке 9 показаны ФВ-031 и PACE при 5%; на дорожке 10 показан ФВ-031 при 7,5%; на дорожке 11 показаны ФВ-031 и PACE при 10%.

Фиг. 21 А) анализ связывания гетеродимера Ф VIII:ФВ (например, Ф VIII-155/ФВ-031), проведенный при помощи октетной установки ForteBio. Для анализа при помощи сенсора APS был снят полноразмерный ФВ. На нижней левой панели показано связывание Ф VIIIIFc и Ф VIII с полноразмерным ФВ. На нижней правой панели показано отсутствие связывания между Ф VIII-1680 (мутантом, не обладающим аффинностью к ФВ) и гетеродимером Ф VIII:ФВ (Ф VIII-155/ФВ-031). На Б) приведен другой анализ связывания гетеродимера Ф VIII:ФВ (например, Ф VIII-155/ФВ-031). При проведении этого анализа

конструкции (конструкция ФВ-031, Ф VIII-155/ФВ-031 или Ф VIII) были обездвижены на G-белковом сенсоре. Было определено связывание конструкций с Ф VIII.

Фиг. 22 - аффинность связывания доменов D'D3 ФВ с молекулой Ф VIII, определенная экспериментом по поверхностному плазмонному резонансу. Конструкция ФВ-031 (100 КЕ) захватывалась античеловеческим IgG в 1000 КЕ. Ф VIII с удаленным В-доменом применяли в одноциклическом кинетическом режиме в соотношении 1:1. Общее количество составляло 4.

Фиг. 23 - влияние различной длины линкеров в гетеродимерных конструкциях Ф VIIIIFc/ФВ на фармакокинетику при применении на Ф VIII/ФВ ДГН мышах. Между D'D3 и Fc были вставлены три различных линкера (в 48 а.к., 73 а.к. или 98 а.к.), т.е. ФВ-031, ФВ-035 и ФВ-036. Активность Ф VIII, нормированная относительно 5-минутной, величины (%) показана на оси Y.

Фиг. 24 - примеры лигирования сортазой фрагмента ФВ с Ф VIII. На А) показаны две конструкции лигирования, где (1) фрагмент ФВ в области С-конца сшит с распознающим сортазу мотивом (например, LPXTG), и (2) Ф VIII содержит глицин (n) в области N-конца. После реакции с сортазой фрагмент ФВ и распознающий сортазу мотив оказываются лигированными к N-концу Ф VIII. На Б) показаны две конструкции лигирования, где (1) Ф VIII в области С-конца сшит с распознающим сортазу мотивом, и (2) фрагмент ФВ содержит глицин (n) в области N-конца. После реакции с сортазой Ф VIII и распознающий сортазу мотив оказываются сшитыми с фрагментом ФВ в N-конце фрагмента ФВ. На В) показаны две конструкции лигирования, где (1) фрагмент ФВ сшит с распознающим сортазу мотивом при помощи линкера переменной длины, и (2) Ф VIII в области N-конца сшит с глицином (n). После реакции с сортазой ФВ, сшитый при помощи линкера с распознающим сортазу мотивом, оказывается лигированным к N-концу Ф VIII. На Г) показаны две конструкции лигирования, где (1) Ф VIII сшит с распознающим сортазу мотивом при помощи линкера переменной длины, и (2) фрагмент ФВ в области N-конца сшит с глицином (n). После реакции с сортазой Ф VIII, сшитый при помощи линкера с распознающим сортазу мотивом, оказывается лигированным к N-концу фрагмента ФВ. На Д) показана конструкция лигирования, содержащая фрагмент ФВ, сшитый с распознающим сортазу мотивом при помощи линкера переменной длины, который также сшит с сайтом расщепления протеазой (например, сайтом расщепления тромбина), сшитом с Fc при помощи линкера переменной длины.

Фиг. 25 - схематическое сравнение Ф VIII-155 и Ф VIII-198. Ф VIII-155 кодирует одноцепочечный белок Ф VIIIIFc. Ф VIII-198 является одноцепочечной молекулой-226N6 Ф VIIIIFc, содержащей частичный В-домен. 226 обозначает 226 N-концевых аминокислот В-домена Ф VIII, а N6 обозначает шесть участков N-гликозилирования в В-домене.

Фиг. 26. На А) показан анализ стабильности, в котором определяется относительная активность Ф VIII-155 и Ф VIII-198 в ДГН-плазме как функция времени. Как видно из фигуры, наличие частичного В-домена в Ф VIII-198 повысило стабильность одноцепочечного Ф VIIIIFc по сравнению с Ф VIII-155; на Б) показано сравнение времен полужизни Ф VIII-155 и Ф VIII-198 и двухцепочечного (дЦФ VIIIIFc) в ДГН мышах. Как видно из фигуры, для одноцепочечного Ф VIII (Ф VIII-155) наблюдается увеличение времени полужизни в 1,5 раза по сравнению с двухцепочечным Ф VIII. Одноцепочечный Ф VIII с 266N6 В-доменом (Ф VIII-198) демонстрирует дополнительно увеличение времени полужизни в 1,5 раза. На графике показана зависимость восстановления Ф VIII от 5-минутного значения (%) как функция времени.

Детальное описание изобретения

Определения

Стоит отметить, что употребление единственного числа по отношению к какому-либо объекту относится к одному или более объектам, например под выражением "нуклеотидная последовательность" подразумевается одна или более нуклеотидных последовательностей. Соответственно, форма единственного числа и термины "один или более" и "по меньшей мере один" могут взаимозаменяется употребляться в данном тексте.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" включает в себя как одиночную нуклеиновую кислоту, так и множественные нуклеиновые кислоты, и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например информационной РНК (иРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). В определенных вариантах реализации изобретения полинуклеотид содержит обычную фосфодиэфирную связь или альтернативную связь (например, амидную связь, которую можно обнаружить в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" к какому-либо одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенными" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была удалена из своей естественной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид фактора VIII, содержащийся в векторе, считается выделенным в контексте настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичной клетке-хозяине или очищенные (частично или в значительной степени) от других полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК транскрипты полинуклеотидов, являющихся объектами настоящего изобретения. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим способом. В добавок поли-

нуклеотид или нуклеиновая кислота может содержать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, участки связывания рибосом или сигналы терминации транскрипции.

При употреблении в данном тексте "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" представляют собой фрагмент полинуклеотида, который состоит из кодонов, которые могут транслироваться в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) обычно не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и т.п. элементы не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области обычно определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующем аминоконец результирующего полипептида, и трансляционным стоп-кодоном на 3'-конце, кодирующем карбоксильный конец результирующего полипептида. Две или более кодирующих областей согласно настоящему изобретению могут присутствовать в одиночной полинуклеотидной конструкции, например в одиночном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например в отдельных (различных) векторах. Следовательно, отсюда вытекает, что одиночный вектор может содержать только одиночную кодирующую область или содержать две или более кодирующих областей, например одиночный вектор может отдельно кодировать связывающий домен-А и связывающий домен-В, как описано ниже. Вдобавок вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, являющиеся объектами данного изобретения, могут кодировать гетерологичные кодирующие области как сшитые, так и несшитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий домен согласно изобретению. Гетерологичные кодирующие области без ограничений включают специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Определенные белки, секрецииемые клетками млекопитающих, связаны с секреторным сигнальным пептидом, который отщепляется от зрелого белка, как только инициируется экспорт растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что сигнальные пептиды в общем случае сшиты с N-концом полипептида для того, чтобы вырабатывать секрецию или "зрелую" форму полипептида. В определенных вариантах реализации изобретения применяется нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, либо функциональное производное такой последовательности, которое сохраняет способность управлять секрецией функционально связанного с ней полипептида. В альтернативном варианте может применяться гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего, например человеческий тканевой активатор плазминогена (ТАП) или мышиный сигнальный пептид β-глюкуронидазы, либо его функциональное производное.

Термин "нижележащая" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 3' от основной нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах реализации изобретения нижележащие нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за точкой старта транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже сайта старта транскрипции.

Термин "вышележащая" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 5' от основной нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах реализации изобретения вышележащие нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые расположены на 5' стороне кодирующей области или точки старта транскрипции. Например, большинство промоторов располагаются выше сайта старта транскрипции.

При употреблении в данном тексте "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (в направлении 5' некодирующих последовательностей), в рамках или ниже (в направлении 3' некодирующих последовательностей) кодирующей области, и которые оказывают влияние на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию связанной с ней кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, трансляционные лидерные последовательности, интроны, последовательности распознавания полиденилирования, участки процессинга РНК, участки связывания эффекторов и структуры типа "стебель-петля". Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнальная последовательность полиденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно расположены в направлении 3' относительно кодирующей последовательности.

Полинуклеотид, который кодирует генный продукт, например полипептид, может включать промотор и/или другие транскриptionные или трансляционные контрольные элементы, функционально связанные с одной или более кодирующими областями. Находящаяся в функциональной связи кодирующая область для генного продукта, например полипептида, связана с одной или более регуляторными областями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта оказалась под влиянием или контролем регуляторной области(областей). Например, кодирующая область и промотор являются функционально связанными, если индукция действия промотора приводит к транскрипции и РНК, кодирующей генный продукт, кодируемый кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не препятствует возможности промотора управлять экспрессией генного продукта или не препятствует возможности транскрибирования ДНК-матрицы. Другие транскриptionные контрольные элементы,

кроме промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально связанными с кодирующей областью для того, чтобы управлять экспрессией генного продукта.

Специалистам в данной области техники известно множество транскрипционных контрольных областей. Они включают без ограничения транскрипционные контрольные области, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (предранний промотор в сочетании с инtronом-А), вирус обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусы (такие как вирус саркомы Рауса). Другие транскрипционные контрольные области включают те, которые получены из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и кроличий β-глобин, а также другие последовательности, способные контролировать генную экспрессию в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие транскрипционные контрольные области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также лимфокин-индукционные промоторы (например, индуцильные интерферонами или интерлейкинами промоторы).

Аналогично, специалистам в данной области техники известно множество трансляционных контрольных элементов. Они включают без ограничения участки связывания рибосом, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы или УВПР, также называемый СITE-последовательностью).

Употребляемый в данном тексте термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например РНК или полипептид. Он включает без ограничения транскрипцию полинуклеотида в информационную РНК (иРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпилечную РНК (мшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой РНК-продукт и трансляцию иРНК в полипептид. При помощи экспрессии получают "генный продукт". При употреблении в данном тексте генный продукт может представлять нуклеиновую кислоту, например информационную РНК, полученную посредством транскрипции гена, или полипептид, который был транслирован с транскрипта. Описанные в данном тексте генные продукты дополнительно включают нуклеиновые кислоты, прошедшие пост-транскрипционные модификации, например полиаденилирование или сплайсинг, или полипептиды, прошедшие пост-транскрипционные модификации, например метилирование, гликозилирование, добавление липидов, объединение с другими белковыми субъединицами или протеолитическое расщепление.

"Вектор" относится к любому средству для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Вектор может являться репликоном, к которому может быть присоединен сегмент другой нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы привести к репликации присоединенного сегмента. "Репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует как автономная единица репликации *in vivo*, т.е. способен к самостоятельно управляемой репликации. Термин "вектор" включает как вирусной, так и невирусной природы средства для внесения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В данной области техники известно и применяется большое количество векторов, включая, например, плазмиды, модифицированные эукариотические вирусы или модифицированные бактериальные вирусы. Вставку полинуклеотида в подходящий вектор можно осуществить путем лигирования соответствующих фрагментов полинуклеотида в выбранный вектор, который имеет комплементарные липкие концы.

Векторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы кодировать селектируемые маркеры или репортеры, которые обеспечивают отбор или идентификацию клеток, в которые был инкорпорирован вектор. Экспрессия селектируемых маркеров или репортеров позволяет осуществлять идентификацию и/или отбор клеток-хозяев, которые инкорпорируют и экспрессируют другие кодирующие области, содержащиеся в векторе. Примеры известных и применяемых в данной области техники генов селектируемых маркеров включают гены, обеспечивающие устойчивость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, гербициду биалафос, сульфонамиду и т.п. веществам; и гены, которые применяются в качестве фенотипических маркеров, т.е. регуляторные гены антоцианов, ген изолентенил трансферазы и т.п. Примеры известных и применяемых в данной области техники репортеров включают люциферазу (Люц), зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (ХАТ), -галактозидазу (ЛакЗ), -глюкуронидазу (Гуз) и тому подобные вещества. Селектируемые маркеры также могут считаться репортерами.

Термин "плазмиды" относится к внекромосомному элементу, часто несущему ген, который не является частью центрального метаболизма клетки, и обычно находящемуся в форме кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут являться автономно реплицирующимися последовательностями, интергирующимися в геном последовательностями, фагом или нуклеотидными последовательностями, линейными, кольцевыми или сверхспиральными одно- или двухцепочечных ДНК или РНК, полученными из произвольного источника, в которых определенное число нуклеотидных последовательностей было соединено или рекомбинировано в уникальную конструкцию, которая способна внести в клетку фрагмент промотора и последовательность ДНК для выбранного генного продукта вместе с соответствующей 3' нетранслируемой последовательностью.

Эукариотические вирусные векторы, которые могут применяться, включают, но не ограничиваются

этим, аденоовирусные векторы, ретровирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, покс-вирус, например векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе бакуловирусов или векторы на основе вируса герпеса. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), ДНК-белковые комплексы и биополимеры.

"Клонирующий вектор" относится к "репликону", который является единицей длины нуклеиновой кислоты, которая последовательно реплицируется и которая содержит точку начала репликации, такую как плазмида, фаг или космида, к которой может быть присоединен сегмент другой нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы привести к репликации присоединенного сегмента. Определенные клонирующие векторы способны к репликации в одном типе клеток, например в бактериальных клетках, и экспрессии в другом, например в эукариотических клетках. Клонирующие векторы обычно содержат одну или более последовательностей, которые могут применяться для отбора клеток, содержащих вектор, и/или один или более множественных клонирующих участков для вставки представляющих интерес нуклеотидных последовательностей.

Термин "экспрессионный вектор" относится к элементу, сконструированному для того, чтобы сделать возможной экспрессию вставленной нуклеотидной последовательности после внесения в клетку-хозяин. Вставленная нуклеотидная последовательность размещается в функциональной связи с регуляторными областями, как описано выше.

Векторы вносят в клетки-хозяева способами, хорошо известными в данной области техники, например путем трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, клеточного слияния, при помощи дигитиламиноэтилдекстрана, осаждения фосфата кальция, лиофекции (слияния лизосом), применения генной пушки или транспортера ДНК-вектора.

При употреблении в данном тексте "культтивировать", "культтивирование" и "культивация" обозначают инкубацию клеток в таких *in vitro* условиях, которые способствуют росту клеток, или делению, или поддержанию клеток в живом состоянии. При употреблении в данном тексте "культивированные клетки" обозначают клетки, которые были размножены *in vitro*.

При употреблении в данном тексте термин "полипептид" включает в себя как одиночный "полипептид", так и множественные "полипептиды", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям двух или более аминокислот и не относится к специфичной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" либо любой другой термин, применяемый для обозначения цепи или цепей двух или более аминокислот, включены в определение "полипептида", а термин "полипептид" может применяться вместо либо взаимозаменяю с любым из этих терминов. Термин "полипептид" также относится к продуктам пост-экспрессионной модификации полипептида, включая без ограничений гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию аминокислотами неприродного происхождения. Полипептид может быть получен из природного биологического ресурса или при помощи рекомбинантной технологии, но не обязательно являться транслированным из определенной нуклеотидной последовательности. Он может быть получен любым способом, включая химический синтез.

"Выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или производное обозначает полипептид, который не находится в своем естественном окружении. Никакой конкретный уровень очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть просто удален из своего природного или естественного окружения. Полученные при помощи рекомбинантных технологий полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными в контексте данного изобретения, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы либо частично или в значительной степени очищены любым подходящим способом.

Также в настоящее изобретение включены фрагменты или варианты полипептидов и любые их комбинации. Термин "фрагмент" или "вариант" в отношении связывающих доменов полипептидов или связывающих молекул, являющихся объектами настоящего изобретения, включают любые полипептиды, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторые свойства (например, аффинность связывания с FcRn в случае FcRn-связывающего домена или Fc-варианта, активность коагуляции в случае Ф VIII-варианта или Ф VIII-связывающую активность в случае фрагмента ФВ) основного полипептида. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты дополнительно к специфическим фрагментам антител, обсуждаемым в другом месте данного текста, но не включают полноразмерный полипептид природного происхождения (или зрелый полипептид). Варианты связывающих доменов полипептидов или связывающих молекул, являющихся объектами настоящего изобретения, включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с аминокислотными последовательностями, измененными вследствие аминокислотных замен, делеций или инсерций. Варианты могут быть природного и неприродного происхождения. Варианты неприродного происхождения могут быть получены путем известных в данной области техники методов мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавки.

Употребляемый в данном тексте термин "фрагмент ФВ" или "фрагменты ФВ" обозначает любые

фрагменты ФВ, которые взаимодействуют с Ф VIII и сохраняют по меньшей мере одно или более свойств, которые обычно обеспечивает Ф VIII полноразмерный ФВ, например предотвращение преждевременной активации Ф VIII, предотвращение преждевременного протеолиза, предотвращение связывания с фосфолипидными мембранами, которое может привести к преждевременному клиренсу, предотвращение связывания с клиренс-рецепторами Ф VIII, которые могут связывать незащищенный Ф VIII, но не ФВ-связанный Ф VIII, и/или стабилизацию взаимодействий тяжелой цепи и легкой цепи Ф VIII. Употребляемый в данном тексте термин "фрагмент ФВ" не включает полноразмерный или зрелый белок ФВ. В конкретном варианте реализации изобретения упоминаемый в данном тексте "фрагмент ФВ" содержит домен D' и домен D3 белка ФВ, но не содержит домен A1, домен A2, домен A3, домен D4, домен B1, домен B2, домен B3, домен C1, домен C2 и домен СК белка ФВ.

Употребляемый в данном тексте термин "фактор, ограничивающий время полужизни" или "фактор, ограничивающий время полужизни Ф VIII" определяет фактор, который предупреждает продление времени полужизни белка Ф VIII более чем в 1,5 раза или 2 раза по сравнению с Ф VIII дикого типа (например, ADVATE® или REFACTO®). Например, полноразмерный или зрелый ФВ может действовать как фактор, ограничивающий время полужизни Ф VIII, индуцируя выведение комплекса Ф VIII и ФВ из системы в процессе одного или более каскадов очистки ФВ. В одном примере эндогенный ФВ является фактором, ограничивающим время полужизни Ф VIII. В другом примере полноразмерная рекомбинантная молекула ФВ, нековалентно связанная с белком Ф VIII, является фактором, ограничивающим время полужизни Ф VIII.

Употребляемый в данном тексте термин "эндогенный ФВ" определяет молекулы ФВ, присутствующие в плазме в природном состоянии. Эндогенная молекула ФВ может являться мультимером, но может быть и мономером или димером. Эндогенный ФВ в плазме связывается с Ф VIII и образует с Ф VIII нековалентный комплекс.

"Консервативной аминокислотной заменой" является такая, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамины, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), β -разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде замещается другой аминокислотой, принадлежащей тому же семейству боковых цепей, такая замена считается консервативной. В другом варианте реализации изобретения ряд аминокислот может быть консервативно заменен структурно подобным рядом, который отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" между двумя полипептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности одного полипептида с последовательностью второго полипептида. При обсуждении в данном тексте определение того, является ли любой конкретный полипептид идентичным по меньшей мере на около 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% другому полипептиду, осуществляется при помощи известных в данной области техники методов и компьютерных программ/программного обеспечения, включающих, но не ограничивающихся этим, программу BESTFIT (WisconsinSequenceAnalysisPackage, Версия 8 для Unix, GeneticsComputer-Group, UniversityResearchPark, 575 ScienceDrive, Madison, WI 53711). BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана, AdvancesinAppliedMathematics 2:482-489 (1981) для того, чтобы найти сегмент наибольшей гомологии между двумя последовательностями. При применении BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной основной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры устанавливают, конечно, таким образом, что процент идентичности рассчитывается относительно полной длины основной полипептидной последовательности и допускаются расхождения в гомологии до 5% относительно общего числа аминокислот в основной последовательности.

При употреблении в данном тексте "аминокислота, соответствующая чему-либо" или "эквивалентная аминокислота" в последовательности ФВ или последовательности белка Ф VIII определяются по выравниванию с целью максимизировать идентичность или сходство между первой последовательностью ФВ или Ф VIII и второй последовательностью ФВ или Ф VIII. Число, применяемое для определения эквивалентной аминокислоты во второй последовательности ФВ или Ф VIII, зависит от числа, применяемого для определения соответствующей аминокислоты в первой последовательности ФВ или Ф VIII.

"Слитый" или "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она не связана в естественном состоянии. Аминокислотные последовательности, которые обычно присутствуют в разных белках, могут быть

соединены вместе в слитом полипептиде, либо аминокислотные последовательности, которые обычно присутствуют в одном белке, могут быть размещены в новом порядке в слитом полипептиде, примером чего является слияние домена фактора VIII, являющегося объектом данного изобретения, с Fc-доменом иммуноглобулина. Слитый белок создают, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются в необходимом взаиморасположении. Химерный белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью ковалентной, непептидной связью или нековалентной связью.

Употребляемый в данном тексте термин "время полужизни" относится к биологическому времени полужизни конкретного полипептида *in vivo*. Время полужизни может обозначать время, необходимое для того, чтобы половина количества введенного испытуемому объекту препарата была выведена из кровообращения и/или других тканей животного. При построении кривой выведения данного полипептида как функции времени кривая обычно является двухфазной с быстрой α -фазой и более длинной β -фазой. α -фаза обычно отображает равновесное распределение введенного Fc полипептида между внутрисосудистым и внесосудистым пространством и частично определяется размером полипептида. β -фаза обычно отображает катаболизм полипептида во внутрисосудистом пространстве. В некоторых вариантах реализации изобретения Ф VIII и содержащие Ф VIII химерные белки являются монофазными и, таким образом, не имеют α -фазы, а только β -фазу. Следовательно, в определенных вариантах реализации изобретения употребляемый в данном тексте термин "время полужизни" относится ко времени полужизни полипептида в β -фазе. Обычное время полужизни β -фазы человеческого антитела у человека составляет 21 день.

При применении к полинуклеотиду или полипептиду термин "гетерологичный" означает, что полинуклеотид или полипептид получены из объекта, отличного от того объекта, с которым проводится сравнение. Следовательно, гетерологичный полипептид, связанный с фрагментом ФВ, обозначает полипептидную цепь, которая связана с фрагментом ФВ и не является частью фрагмента ФВ природного происхождения. Например, гетерологичный полипептид или антиген может быть получен от различных видов, из различных типов клеток особи либо одинаковых или различных типов клеток различных особей.

Употребляемый в данном тексте термин "связанный" относится к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно соединенной со второй аминокислотной последовательностью или нуклеотидной последовательностью соответственно. Термин "ковалентно связанный" или "ковалентная связь" относится к ковалентной связи, например, дисульфидной связи, пептидной связи или одной или более аминокислотам, например линкеру, между двумя связанными между собой компонентами. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть прямым образом связана или соединена со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью, или в другом варианте промежуточная последовательность может ковалентно связывать первую последовательность со второй последовательностью. Термин "связанный" обозначает не только сшивание первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью в области С-конца или N-конца, но также включает вставку полной первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) между любыми двумя аминокислотами второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности соответственно). В одном варианте реализации изобретения первая аминокислотная последовательность может быть соединена со второй аминокислотной последовательностью посредством пептидной связи или линкера. Первая аминокислотная последовательность может быть соединена со второй аминокислотной последовательностью посредством фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (для полипептидных цепей) или нуклеотид или нуклеотидную цепь (для нуклеотидных цепей) либо любое химическое соединение (как для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Ковалентную связь иногда обозначают как (-) или дефис. Употребляемый в данном тексте термин "связанный с" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В одном варианте реализации изобретения термин "связанный с" обозначает ковалентную, непептидную связь или нековалентную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения такую связь обозначают двоеточием, т.е. (:). В другом варианте реализации изобретения он обозначает ковалентную связь за исключением пептидной связи. В других вариантах реализации изобретения употребляемый в данном тексте термин "ковалентно связанный" обозначает связь между двумя компонентами посредством ковалентной связи, например дисульфидной связи, пептидной связи или одной или более аминокислот (например, линкера). Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиольной группой второго остатка цистеина. В большинстве молекул IgG природного происхождения области CH1 и CL связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в позициях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации Кабата (позиции 226 и 229 в Европейской системе нумерации). Примеры ковалентных связей включают, но не ограничиваются этим, пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь,

пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, диполярную связь, пи-обратную связь, двойную связь, тройную связь, четвертную связь, пятерную связь, шестерную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптичность или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (например, катионную пи-связь или соляную связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь или симметричную водородную связь), Ван-дер-Ваальсовы силы, лондоновские дисперсионные силы, механическую связь, галогенную связь, аурафильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийные силы или химическую полярность.

Употребляемый в данном тексте термин "мономерно-димерный гибрид" относится к химерному белку, содержащему первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, которые связаны друг с другом дисульфидной связью, при этом первая цепь содержит фактор свертывания крови, например фактор VIII, и Fc-область, а вторая цепь содержит, состоит преимущественно из или состоит из Fc-области без фактора свертывания крови. Мономерно-димерная гибридная конструкция, таким образом, является гибридом, содержащим мономерную часть, содержащую только один фактор свертывания крови, и димерную часть, содержащую две Fc-области.

Употребляемый в данном тексте термин "сайт расщепления" или "сайт ферментного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. Определенные сайты ферментного расщепления содержат сайт внутриклеточного процессинга. В одном варианте реализации изобретения полипептид содержит сайт ферментного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется во время каскада свертывания таким образом, что расщепление таких сайтов происходит на участке образования тромба. Примеры таких сайтов включают, например, те, которые распознаются тромбином, фактор Xa или фактор Xa. Примеры сайтов расщепления Ф Xa включают, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 47) и SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 48). Примеры сайтов расщепления тромбином включают, например, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 49), TTKIKPQR (SEQ ID NO: 50), LVPRG (SEQ ID NO: 55) и ALRPR (амино-кислоты от 1 до 5 из SEQ ID NO: 51). Другие сайты ферментного расщепления известны в данной области техники.

Употребляемый в данном тексте термин "сайт процессинга" или "сайт внутриклеточного процессинга" относится к такому типу сайтов ферментного расщепления в полипептиде, являющемуся целью для ферментов, которые действуют после трансляции полипептида. В одном варианте реализации изобретения такие ферменты действуют во время переноса из полости аппарата Гольджи в транс-Гольджи компартмент. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, те, на которые нацелены представители семейства PACE/фурина (где PACE является акронимом от англ. "Paired basic Aminoacid Cleaving Enzyme" - фермент, расщепляющий спаренные основные аминокислоты) эндопептидаз. Эти ферменты находятся в мембране Гольджи и расщепляют белки со стороны карбоксильного конца мотива последовательности Arg-[любой остаток]-Lys или Arg-Arg. Упоминаемые в данном тексте представители "фуринового" семейства ферментов включают, например, PCSK1 (также известный как PC1/PC3), PCSK2 (также известный как PC2), PCSK3 (также известный как фурина или PACE), PCSK4 (также известный как PC4), PCSK5 (также известный как PC5 или PC6), PCSK6 (также известный как PACE4) или PCSK7 (также известный как PC7/LPC, PC8 или SPC7). Другие сайты процессинга известны в данной области техники.

Термин "фурина" относится к ферментам, соответствующим ЕС №. 3.4.21.75. Фурин является субтилизинподобной пробелковой конвертазой, которая также известна под названием PACE (Paired basic Aminoacid Cleaving Enzyme). Фурин удаляет секции неактивных белков-предшественников для того, чтобы конвертировать их в биологически активные белки. Во время своего внутриклеточного перемещения пропептид отщепляется от зрелой молекулы ФВ ферментом фурином в аппарате Гольджи.

Понятно, что в конструкциях, содержащих более одного сайта процессинга или расщепления, данные сайты могут быть одинаковыми либо разными.

При употреблении в данном тексте гемостатическое нарушение означает генетически унаследованное или приобретенное заболевание, которое характеризуется склонностью к кровоизлияниям, как к спонтанным, так и в результате травмы, из-за нарушения способности или неспособности образовывать фибриновые сгустки. Примеры таких нарушений включают разные виды гемофилии. Тремя основными формами являются гемофилия А (дефицит фактора VIII), гемофилия В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и гемофилия С (дефицит фактора XI, склонность к умеренным кровотечениям). Другие гемостатические нарушения включают, например, болезнь Виллебранда, дефицит фактора XI (дефицит ПТП), дефицит фактора XII, дефицит или структурные аномалии фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, который является дефектом или дефицитом GPIb. GPIb - рецептор для ФВ - может быть дефективным и приводить к недостатку первичного тромбообразования (первичного гемостаза) и повышенной склонности к кровотечениям, и тромбастении Гланцманна и Негели (тромбастении Гланцманна). При печеночной недостаточности (острой и хронической формах) наблюдается недостаточная выработка факторов свертывания крови печенью, что может привести к повышенному риску кровотечений.

Химерные молекулы, являющиеся объектом данного изобретения, можно применять в профилактических целях. Употребляемый в данном тексте термин "профилактическое лечение" относится к применению данной молекулы до случая кровотечения. В одном варианте реализации изобретения пациенту, нуждающемуся в общем гемостатическом средстве, проводят или собираются проводить хирургическую операцию. Химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, можно применять до или после хирургической операции в качестве профилактики. Химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, можно применять во время или после хирургической операции для контролирования острых случаев кровотечения. Хирургическая операция может включать, но не ограничивается этим, трансплантацию печени, резекцию печени, стоматологические процедуры или трансплантацию стволовых клеток.

Химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, также применяется для лечения по требованию (также называемому "эпизодическим"). Термин "лечение по требованию" или "эпизодическое лечение" относится к применению химерной молекулы в ответ на проявление симптомов случая кровотечения или перед действием, которое может вызвать кровотечение. В одном аспекте реализации лечение пациента по требованию (эпизодическое лечение) может проводиться тогда, когда кровотечение началось, например, после травмы, или тогда, когда кровотечение ожидается, например, перед хирургической операцией. В другом аспекте реализации лечение пациента по требованию может проводиться до действий, которые повышают риск кровотечения, например в случае контактного спорта.

Употребляемый в данном тексте термин "острое кровотечение" относится к случаю кровотечения вне зависимости от его причин. Например, пациент может получить травму, страдать уремией, наследственным нарушением, связанным с кровотечением (например, дефицитом фактора VII), нарушением тромбоцитарного звена гемостаза или обладать сопротивлением благодаря выработке антител к факторам свертывания крови.

При употреблении в данном тексте лечение, проведение лечения, осуществление лечения относится, например, к снижению степени тяжести заболевания или болезненного состояния; снижению продолжительности заболевания; уменьшению интенсивности одного или более симптомов, связанных с заболеванием или болезненным состоянием, без обязательного излечения заболевания или болезненного состояния или предупреждения одного или более симптомов, связанных с заболеванием или болезненным состоянием. В одном варианте реализации изобретения термин "лечение" или "проведение лечения" означает поддержание у пациента минимального уровня Ф VIII, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 МЕ/дл, путем введения химерного белка или фрагмента ФВ, которые являются объектами данного изобретения. В другом варианте реализации изобретения лечение или проведение лечения означает поддержание минимального уровня Ф VIII между около 1 и около 20 МЕ/дл, около 2 и около 20 МЕ/дл, около 3 и около 20 МЕ/дл, около 4 и около 20 МЕ/дл, около 5 и около 20 МЕ/дл, около 6 и около 20 МЕ/дл, около 7 и около 20 МЕ/дл, около 8 и около 20 МЕ/дл, около 9 и около 20 МЕ/дл или около 10 и около 20 МЕ/дл. Лечение или проведение лечения заболевания или болезненного состояния также может включать поддержание активности Ф VIII у пациента на уровне, сравнимом по меньшей мере приблизительно с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% активности Ф VIII у пациента, не страдающего гемофилией. Минимальный уровень, необходимый для проведения лечения, может быть определен при помощи одного или более известных способов и может быть подобран (увеличен или уменьшен) для каждого отдельного пациента.

Химерные белки.

Настоящее изобретение относится к продлению времени полужизни белка фактора VIII путем предотвращения или подавления *in vivo* связывания фактора, ограничивающего время полужизни Ф VIII (например, эндогенного ФВ) с белком Ф VIII. Эндогенный ФВ связывает от около 95 до около 98% Ф VIII в нековалентные комплексы. Известно, что связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII защищает Ф VIII разными способами. Например, полноразмерный ФВ (в виде мультимера размером в около 250 кДа) может защитить Ф VIII от протеазного расщепления и активации Ф VIII, стабилизировать тяжелую цепь и/или легкую цепь Ф VIII и предотвратить выведение Ф VIII фагоцитарными рецепторами. При этом в то же время эндогенный ФВ ограничивает время полужизни Ф VIII путем предотвращения пиноцитоза и путем выделения комплекса Ф VIII-ФВ из системы в процессе очищения ФВ. Считается, как показано в примерах, что эндогенный ФВ является ограничивающим время полужизни фактором, который препятствует продлению времени полужизни белка Ф VIII, слитого с компонентом, продлевающим время полужизни, более чем приблизительно в два раза по отношению к Ф VIII дикого типа. Следовательно, в настоящем изобретение предотвращается или подавляется взаимодействие между эндогенным ФВ и белком Ф VIII при помощи дополнительного компонента, и, тем самым, предотвращается выведение белка Ф VIII в процессе очищения ФВ и/или индукция пиноцитоза. В одном варианте реализации изобретения дополнительный компонент способен предотвращать или подавлять связывание белка Ф VIII с эндогенным ФВ и обладает по меньшей мере одним ФВ-подобным Ф VIII-защитным свойством. Вдобавок дополнительный компонент снижает выведение Ф VIII из системы, предотвращая или подавляя взаимодействие с эндогенным ФВ. Дополнительные компоненты, являющиеся объектами настоящего изобретения, связываются или ассоциируют с (например, путем нековалентного связывания) белком Ф VIII и/или

физически или химически блокируют ФВ-связывающий участок белка Ф VIII. Таким образом, белок Ф VIII, связанный с дополнительным компонентом, выводится из кровообращения клиренс-рецепторами ФВ более медленно по сравнению с Ф VIII дикого типа или несвязанным с дополнительным компонентом Ф VIII. Примеры дополнительных компонентов, являющихся объектами настоящего изобретения, включают, например, полипептиды либо химические или физические модификации, добавления, делеции или вариации белка Ф VIII. Дополнительный компонент, применяемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид, неполипептидный компонент или оба эти компонента. Неограничивающие примеры полипептида, применяемого в качестве дополнительного компонента, включают, например, описанный в данном тексте фрагмент ФВ, константную область иммуноглобулина или ее часть, трансферрин или его фрагмент, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность НАР, последовательность PAS или любые комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любую комбинацию этих компонентов. Другие подобные компоненты, применяемые в настоящем изобретении, известны в данной области техники.

В одном варианте реализации изобретения дополнительный компонент соединен (или связан) с белком Ф VIII ковалентной или нековалентной связью. При этом в некоторых случаях физическое блокирование или химическая связь (например, нековалентное связывание) между дополнительным компонентом и белком Ф VIII могут быть недостаточно сильными для того, чтобы обеспечить существование устойчивого комплекса, содержащего белок Ф VIII и дополнительный компонент, в присутствии эндогенного ФВ. Например, фрагмент ФВ, образующий нековалентную связь с белком Ф VIII без каких-либо дополнительных соединений, может легко быть отделен *in vivo* от белка Ф VIII в присутствии эндогенного ФВ, при этом фрагмент ФВ (например, рекомбинантного ФВ, т.е. рФВ) замещается эндогенным ФВ. Следовательно, нековалентно связанный с эндогенным ФВ белок Ф VIII будет подвержен процессу очистки ФВ и будет выведен из системы. С целью предотвращения отделения дополнительного компонента от белка Ф VIII в некоторых вариантах реализации изобретения связь между белком Ф VIII и дополнительным компонентом является ковалентной связью, например пептидной связью, одной или более аминокислотами либо дисульфидной связью. В определенных вариантах реализации изобретения соединение (т.е. связь) между дополнительным компонентом и белком Ф VIII является пептидной связью или линкером между белком Ф VIII и дополнительным компонентом ("линкер Ф VIII/ДК"). Неограничивающие примеры линкеров описаны в другом месте данного текста. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный компонент является полипептидом, содержащим, состоящим преимущественно из или состоящим по меньшей мере из 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000 или 4000 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения дополнительный компонент является полипептидом, содержащим, состоящим преимущественно из или состоящим из от около 100 до около 200 аминокислот, от около 200 до около 300 аминокислот, от около 300 до около 400 аминокислот, от около 400 до около 500 аминокислот, от около 500 до около 600 аминокислот, от около 600 до около 700 аминокислот, от около 700 до около 800 аминокислот, от около 800 до около 900 аминокислот или от около 900 до около 1000 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный компонент, ковалентно связанный с белком Ф VIII, является фрагментом ФВ, описанным в другом месте данного текста.

В определенных вариантах реализации изобретения дополнительный компонент химически (например, нековалентно) связывается с или физически блокирует один или более ФВ-связывающих участков белка Ф VIII. ФВ-связывающий участок белка Ф VIII расположен в пределах домена А3 или домена С2 белка Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения ФВ-связывающий участок белка Ф VIII расположен в пределах домена А3 и домена С2. Например, ФВ-связывающий участок белка Ф VIII может соответствовать аминокислотам от 1669 до 1689 и/или от 2303 до 2332 из SEQ ID NO: 16 [полноразмерный зрелый Ф VIII].

В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом настоящего изобретения, содержит белок Ф VIII, связанный с дополнительным компонентом, при этом дополнительный компонент является молекулой ФВ, например фрагментом ФВ, содержащим домен D' и домен D3, но не содержащим участок связывания клиренс-рецептора ФВ, и экранирует или защищает ФВ-связывающий участок белка Ф VIII, тем самым подавляя или предотвращая взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный компонент является фрагментом ФВ. Фрагмент ФВ, применяемый в настоящем изобретении, содержит домен D' и домен D3, обеспечивая белку Ф VIII одно или более преимуществ ФВ-подобных свойств, но при этом фрагмент ФВ не подвергается процессу очистки ФВ. Белок Ф VIII и дополнительный компонент могут быть ковалентно связанными посредством линкера (например, линкера Ф VIII/ДК). В одном варианте реализации изобретения линкер может являться отщепляемым линкером. Неограничивающие примеры линкеров приведены в другом месте данного текста.

В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом настоящего изобретения, содержит белок Ф VIII и константную область иммуноглобулина или ее часть (т.е. дополнительный компонент), при этом константная область иммуноглобулина или ее часть экранирует или защищает ФВ-

связывающий участок белка Ф VIII, тем самым подавляя или предотвращая взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ. В других вариантах реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть является Fc-областью.

Один аспект реализации настоящего изобретения относится к химерному или слитому белку либо гибридну, содержащему один или более из описанных в данном тексте фрагментов ФВ, и его применению. Химерный или слитый белок может быть сшит или связан с одним или более гетерологичным компонентом (иногда обозначаемом в данном тексте как Н или Н1). В одном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) является гетерологичным пептидом или гетерологичным полипептидом, который в естественных условиях не встречается с и/или связан с фрагментом ФВ. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) является неполипептидным компонентом, например химической модификацией или комбинацией пептида или полипептида и неполипептидного компонента. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты ФВ связаны или соединены с гетерологичным компонентом (Н1) посредством линкера (также называемым в данном тексте "ФВ-линкером"). В одном варианте реализации изобретения ФВ-линкер является отщепляемым линкером. Неограничивающие примеры линкеров между фрагментом ФВ и гетерологичным компонентом (Н1) раскрыты в другом месте данного текста.

В одном варианте реализации гетерологичный компонент (Н1), применяемый в данном изобретении, улучшает одно или более из фармакокинетических свойств фрагментов ФВ без заметного влияния на биологическую активность или функционирование фрагментов ФВ (например, их связывание или соединение с белком Ф VIII). В другом варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1), связанный с фрагментом ФВ, может продлевать время полужизни фрагментов ФВ. Неограничивающие примеры гетерологичного полипептидного компонента включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент либо две или более комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры гетерологичного неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любые комбинации этих компонентов.

В некоторых вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) может применяться для соединения фрагмента ФВ и белка Ф VIII ковалентной связью. Примеры гетерологичного компонента, который может обеспечить ковалентное связывание, включают, но не ограничиваются этим, константную область иммуноглобулина или ее часть, содержащую шарнирный участок, например Fc-область или партнера по связыванию FcRn. В отдельном примере белок Ф VIII связан с первой Fc-областью, а фрагмент ФВ связан со второй Fc-областью, при этом первая Fc-область и вторая Fc-область образуют одну или более дисульфидную связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент (иногда обозначаемый в данном тексте как "Н" или "Н1") является константной областью иммуноглобулина или ее частью. Неограничивающие примеры константной области иммуноглобулина или ее части могут быть выбраны из группы, состоящей из домена СН1, домена СН2, домена СН3, домена СН4, шарнирного домена и двух или более комбинаций этих компонентов. В одном варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит по меньшей мере один домен СН1, по меньшей мере один домен СН2, по меньшей мере один домен СН3, по меньшей мере один домен СН4 или их функциональные фрагменты. В другом варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит по меньшей мере один шарнирный домен или его часть и по меньшей мере один домен СН2 или его часть (например, в ориентации шарнир-СН2). В других вариантах реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит по меньшей мере один домен СН2 или его часть и по меньшей мере один домен СН3 или его часть (например, в ориентации СН2-СН3). Примеры комбинаций включают, но не ограничиваются этим, домен СН2, домен СН3 и шарнирный домен, которые также известны как Fc-область (или Fc-домен), например, первая Fc-область. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) связан с фрагментом ФВ посредством линкера. В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) является партнером по связыванию FcRn, как описано в другом месте данного текста. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент (Н1) является шарнирным участком.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок дополнительно содержит второй (или дополнительный) гетерологичный компонент (иногда обозначаемый в данном тексте как "Н2"). Стоит отметить, что первый гетерологичный компонент (Н1) и второй гетерологичный компонент (Н2) могут применяться взаимозаменяющими и быть одинаковыми либо разными. Второй гетерологичный компонент (Н2) может быть связанным с белком Ф VIII или с любым участком химерного белка пептидной связью, одной или более аминокислотами или посредством линкера (например, линкера Ф VIII в случае связывания с Ф VIII). Такие конструкции иногда могут называться гетеродимерами Ф VIII/ФВ. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н2) содержит гетерологичный полипептид. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный компонент (Н2) содержит неполипептидный компонент. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент (Н2) содержит

жит комбинацию гетерологичного компонента и неполипептидного компонента. Второй гетерологичный компонент (H2) может являться компонентом, продлевающим время полужизни. Неограничивающие примеры второго гетерологичного полипептидного компонента (H2) включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент либо две или более комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры гетерологичного неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любые комбинации этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения первый гетерологичный компонент (H1) и второй гетерологичный компонент являются одинаковыми или разными. Каждый или оба компонента - первый гетерологичный компонент (H1) и второй гетерологичный компонент (H2) могут обеспечить продление времени полужизни белка Ф VIII в химерном белке, обеспечить соединение, более сильное, чем нековалентная связь, т.е. одну или более ковалентных связей между белком Ф VIII и фрагментом ФВ в химерном белке, либо и то, и другое. После того как фрагмент ФВ, сшитый или связанный с гетерологичным компонентом (H1) снимает ограничение по времени полужизни путем предотвращения или подавления взаимодействия между белком Ф VIII и эндогенным белком ФВ, связанный с гетерологичными компонентами белок Ф VIII может достичь своего полного потенциала и может иметь время полужизни, более чем двукратно превышающее таковое у Ф VIII дикого типа.

В определенных вариантах реализации изобретения первый гетерологичный компонент (например, первая Fc-область), связанный с фрагментом ФВ, и второй гетерологичный компонент (например, вторая Fc-область), связанный с белком Ф VIII, соединены друг с другом таким образом, что это соединение препятствует замещению фрагмента ФВ эндогенным ФВ *in vivo*. В одном варианте реализации изобретения второй гетерологичный компонент является второй Fc-областью, при этом вторая Fc-область связана или соединена с первым гетерологичным компонентом, например первой Fc-областью, ковалентной связью, например дисульфидной связью, пептидной связью или посредством линкера (одной или более аминокислотами). Например, второй гетерологичный компонент (например, вторая Fc-область), связанный с белком Ф VIII со стороны одного конца, может быть дополнительно связанным с первым гетерологичным компонентом (например, первой Fc-областью), связанным с фрагментом ФВ посредством линкера (например, оцFc линкером), или соединенным с первым гетерологичным компонентом ковалентной или нековалентной связью. В другом варианте реализации изобретения второй гетерологичный компонент (например, вторая Fc-область) связан с фрагментом ФВ, который уже связан с первым гетерологичным компонентом. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую фрагмент ФВ и первый гетерологичный компонент, и вторую полипептидную цепь, содержащую белок Ф VIII и второй гетерологичный компонент, при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь соединены, причем соединение между первой полипептидной цепью, содержащей первый гетерологичный компонент, и второй полипептидной цепью, содержащей второй гетерологичный компонент, является ковалентной связью, тем самым создавая возможность фрагменту ФВ и белку Ф VIII поддерживать взаимодействие друг с другом. В то же время эндогенный ФВ, который может образовывать нековалентную связь с белком Ф VIII, не может заместить ковалентно связанную полипептидную цепь, содержащую фрагмент ФВ.

Линкер между первым гетерологичным компонентом (H1) и фрагментом ФВ (например, ФВ-линкер) может являться отщепляемым линкером, например тромбин-отщепляемым линкером. Отщепляемые линкеры могут отщепляться протеазой, выбранной из группы, состоящей из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы-2, гранзима B, ВГТ, энтерокиназы, протеазы 3C, соргазы A, ММП-12, ММП-13, ММП-17 и ММП-20 и их комбинаций. Эти отщепляемые линкеры обеспечивают возможность отщепления и отделения фрагмента ФВ от белка Ф VIII после активации каскада реакций свертывания, что приводит к получению белка Ф VIII с полным потенциалом действия.

В других вариантах реализации изобретения химерный белок получают в виде одиночной полипептидной цепи, содержащей фрагмент ФВ, отщепляемый линкер, первый гетерологичный компонент (H1), процессируемый линкер, белок Ф VIII и второй гетерологичный компонент (H2) в любом порядке. После синтеза процессируемый линкер может перед секрецией отщепляться внутриклеточным протеазным ферментом, образуя, таким образом, две полипептидные цепи, как описано выше. В случае конструкции, содержащей одиночную цепь, перед секрецией второй гетерологичный компонент (например, вторая Fc-область) может связываться с фрагментом ФВ посредством процессируемого линкера. В определенных других вариантах реализации изобретения один или более линкеров могут содержать один или более сайтов расщепления.

В некоторых вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, дополнительно содержит третий гетерологичный компонент (иногда обозначаемый в данном тексте как "H3"). Третий гетерологичный компонент (H3) может продлевать время полужизни. Гетерологичный компонент (H3) может содержать гетерологичный полипептид, неполипептидный компонент либо оба эти компонента. Неограничивающие примеры третьего гетерологичного компонента (H3) включают кон-

стантную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, любые производные или варианты либо две или более комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), их производное или любые комбинации этих компонентов. Первый гетерологичный компонент (Н1), связанный с фрагментом ФВ, второй гетерологичный компонент (Н2), связанный с белком Ф VIII, и третий гетерологичный компонент (Н3) могут быть одинаковыми либо разными. В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент (Н1) идентичен второму гетерологичному компоненту (Н2), но отличается от третьего гетерологичного компонента (Н3). В другом варианте реализации изобретения третий гетерологичный компонент (Н3) сшит или связан с белком Ф VIII или фрагментом ФВ химерного белка. В некоторых вариантах реализации третий гетерологичный компонент вставлен в один или более доменов белка Ф VIII или между двумя доменами белка Ф VIII.

В одном варианте реализации изобретения химерный белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом первая цепь содержит белок Ф VIII, связанный с первым гетерологичным компонентом (Н1), например, первой Fc-областью, посредством произвольного линкера (например, Ф VIII-линкера), а вторая цепь содержит фрагмент ФВ, связанный со вторым гетерологичным компонентом (Н2), например, второй Fc-областью, посредством произвольного линкера (например, ФВ-линкера). Белок Ф VIII может дополнительно содержать третий гетерологичный компонент (Н3), например любой продлевающий время полужизни компонент, например альбумин или последовательность PAS, между тяжелой цепью Ф VIII и легкой цепью Ф VIII (т.е. аминокислотный остаток 1648 из SEQ ID NO: 16), являясь, таким образом, одноцепочечным белком Ф VIII. В альтернативном варианте белок Ф VIII может являться двухцепочечным белком, т.е. содержащим тяжелую цепь Ф VIII и легкую цепь Ф VIII, которые соединены друг с другом ковалентной или нековалентной связью (например, металлической связью), при этом тяжелая цепь дополнительно связана с третьим гетерологичным компонентом (Н3), например неструктурным полипептидом, продлевающим время полужизни, альбумином или его фрагментом или последовательностью PAS. В другом варианте реализации изобретения химерный белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом первая цепь содержит белок Ф VIII, связанный с первым гетерологичным компонентом (Н1), например первой Fc-областью, посредством произвольного линкера (например, Ф VIII-линкера), а вторая цепь содержит фрагмент ФВ, связанный с третьим гетерологичным компонентом (Н3), например неструктурным полипептидом, продлевающим время полужизни, альбумином или последовательностью PAS, который связан со вторым гетерологичным компонентом (Н2), например второй Fc-областью, посредством произвольного линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения третий гетерологичный компонент (Н3) (например, полипептид, продлевающий время полужизни) может быть связан с С-концом или N-концом белка Ф VIII или вставлен между двумя доменами белка Ф VIII или между двумя аминокислотами в домене белка Ф VIII. В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, дополнительно содержит четвертый гетерологичный компонент (иногда обозначаемый в данном тексте как "Н4") и/или пятый гетерологичный компонент (иногда обозначаемый в данном тексте как "Н5"). Четвертый и пятый гетерологичные компоненты также могут продлевать время полужизни. Четвертый гетерологичный компонент и/или пятый гетерологичный компонент могут быть одинаковыми или разными с третьим гетерологичным компонентом. Гетерологичный компонент может содержать гетерологичный полипептид, неполипептидный компонент либо комбинацию этих компонента. Неограничивающие примеры четвертого или пятого гетерологичного компонента включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, любые производные или варианты либо две или более комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), их производное или любые комбинации этих компонентов. Первый гетерологичный компонент, второй гетерологичный компонент, третий гетерологичный компонент, четвертый гетерологичный компонент и пятый гетерологичный компонент могут быть одинаковыми либо разными. В некоторых вариантах реализации изобретения четвертый гетерологичный компонент (например, полипептид, продлевающий время полужизни) может быть связан с С-концом или N-концом белка Ф VIII или вставлен между двумя доменами белка Ф VIII или между двумя аминокислотами в домене белка Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения пятый гетерологичный компонент (например, полипептид, продлевающий время полужизни) также может быть связан с С-концом или N-концом белка Ф VIII или вставлен между двумя доменами белка Ф VIII или между двумя аминокислотами в домене белка Ф VIII.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок содержит белок Ф VIII, фрагмент ФВ, первый гетерологичный компонент, второй гетерологичный компонент, третий гетерологичный компонент, четвертый гетерологичный компонент и пятый гетерологичный компонент, при этом первый гетерологичный компонент и второй гетерологичный компонент образуют связь (например, ковалентную связь) между цепью, содержащей белок Ф VIII, и цепью, содержащей фрагменты, а третий

гетерологичный компонент, четвертый гетерологичный компонент и пятый гетерологичный компонент являются продлевающими время полужизни компонентами, и при этом связь между цепью, содержащей белок Ф VIII, и цепью, содержащей фрагменты, является более сильной, чем нековалентное взаимодействие между Ф VIII и фрагментом ФВ, и, тем самым, предотвращается связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит белок Ф VIII, фрагмент ФВ, первый гетерологичный компонент, второй гетерологичный компонент, третий гетерологичный компонент, четвертый гетерологичный компонент, пятый гетерологичный компонент и шестой гетерологичный компонент (иногда обозначаемый в данном тексте как "Н6"), при этом первый гетерологичный компонент и второй гетерологичный компонент образуют связь между цепью, содержащей белок Ф VIII, и цепью, содержащей фрагменты, а третий гетерологичный компонент, четвертый гетерологичный компонент, пятый гетерологичный компонент и шестой гетерологичный компонент являются продлевающими время полужизни компонентами, и при этом связь между цепью, содержащей белок Ф VIII, и цепью, содержащей фрагменты, является более сильной, чем взаимодействие между Ф VIII и фрагментом ФВ, и, тем самым, предотвращается связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из

- (aa) V-L1-H1-L2-H2,
- (bb) H2-L2-H1-L1-V,
- (cc) H1-L1-V-L2-H2, и
- (dd) H2-L2-V-L1-H1,

где V содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ;

каждый из L1 или L2 является произвольным линкером;

H1 содержит первый гетерологичный компонент и

H2 содержит произвольный второй гетерологичный компонент.

Первый гетерологичный компонент и второй гетерологичный компонент либо оба могут являться компонентом, продлевающим время полужизни. В одном варианте реализации изобретения H1 содержит полипептид, неполипептидный компонент либо оба эти компонента. Полипептид, применяемый в качестве H1, может содержать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, любые производные или варианты либо любые комбинации этих компонентов. Неполипептидный компонент может содержать полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту и гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), их производное или вариант или любые комбинации этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения H2 содержит полипептид, неполипептидный компонент либо оба эти компонента. Полипептид, применяемый в качестве H2, может содержать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, любые производные или варианты либо любые комбинации этих компонентов. Неполипептидный компонент может содержать полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), их производное или вариант или любые комбинации этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения линкер между H1 и H2 в формулах (aa) и (bb) является процессируемым линкером. В других вариантах реализации изобретения линкер между фрагментом ФВ и H1 в формулах (aa) и (bb) является отщепляемым линкером, например тромбин-отщепляемым линкером, который может отщепляться тромбином.

Ориентация приведенных в данном тексте формул полипептидов идет от N-конца (слева) до C-конца (справа). Например, формула H-L-V означает формулу NH2-H-L-V-COOH. В одном варианте реализации изобретения описанные в данном тексте формулы могут содержать дополнительные последовательности между двумя компонентами. Например, формула V-L1-H1-L2-H2 может дополнительно содержать последовательности на N-конце V, между V и L1, между L1 и H1, между H1 и L2, между L2 и H2, или на C-конце H2, если не указано иное. В другом варианте реализации изобретения дефис (-) указывает на наличие пептидной связи либо одной или более аминокислот.

В конкретных вариантах реализации изобретения химерный белок содержит, состоит преимущественно из или состоит из одной или более формул, выбранных из группы, состоящей из

- (a1) V-H,
- (a2) H-V,
- (a3) V-L-H,
- (a4) H-L-V,
- (a5) V-L1-H1-H2,
- (a6) H2-H1-L1-V,
- (a7) V-L1-H1:H2,
- (a8) H2:H1-L1-V,
- (a9) V-H1:H2,

- (61) H2:H1-V,
- (62) V-L1-H1-L2-H2,
- (63) H2-L2-H1-L1-V,
- (64) H1-V-H2,
- (65) H1-L1-V-L2-H2 и
- (66) H2-L2-V-L1-H1,

где V один или более из описанных в данном тексте фрагментов ФВ, L, L1 или L2 содержит линкер, H или H1 содержит первый гетерологичный компонент.

В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент (H1) может являться полипептидом, неполипептидным компонентом либо и тем, и другим. Гетерологичный полипептидный компонент может содержать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР или любые комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента, применяемого в качестве H1, включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиглициловый крахмал (ГЭК), их производное или любые комбинации этих компонентов. В другом варианте реализации изобретения H2 содержит второй гетерологичный компонент. Второй гетерологичный компонент может являться полипептидом, неполипептидным компонентом либо и тем, и другим. Гетерологичный полипептидный компонент может содержать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР или любые комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента, применяемого в качестве H1, включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиглициловый крахмал (ГЭК), их производное или любые комбинации этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения линкер между первым гетерологичным компонентом и вторым гетерологичным компонентом является процессируемым линкером. В других вариантах реализации изобретения линкер между фрагментом ФВ и первым гетерологичным компонентом или вторым гетерологичным компонентом является отщепляемым линкером, который содержит один или более сайтов расщепления, например тромбин-отщепляемым линкером.

Химерный белок, являющийся объектом настоящего изобретения, содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из (aa), (бб), (вв), (гг), (а1), (а2), (а3), (а4), (а5), (а6), (а7), (а8), (а9), (б1), (б2), (б3), (б4), (б5) и (б6), и белок Ф VIII, который ковалентно связан или ковалентно соединен с фрагментом ФВ, первым гетерологичным компонентом (например, первой Fc-областью) или вторым гетерологичным компонентом (например, второй Fc-областью) из формулы. В одном варианте реализации изобретения белок Ф VIII связан или соединен с фрагментом ФВ ковалентной или нековалентной связью либо посредством линкера. В другом варианте реализации изобретения белок Ф VIII может быть связан с первым гетерологичным компонентом или вторым гетерологичным компонентом ковалентной или нековалентной связью либо посредством линкера.

В одном варианте реализации химерный белок, являющийся объектом настоящего изобретения, содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ, ковалентно связанный или ковалентно соединенный с белком Ф VIII. Например, химерный белок может содержать фрагмент ФВ и белок Ф VIII, при этом фрагмент ФВ и белок Ф VIII связаны ковалентной непептидной связью, пептидной связью, нековалентной связью или посредством линкера, например отщепляемого линкера. В конкретном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ и белок Ф VIII связаны или взаимодействуют друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей. В другом конкретном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ связан или взаимодействует с белком Ф VIII в области домена A3 Ф VIII, домена C2 Ф VIII или обоих - домена A3 и домена C2 Ф VIII - посредством нековалентной связи. В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ, связанный или взаимодействующий с белком Ф VIII, связан или сшит с первым гетерологичным компонентом. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII, связанный или взаимодействующий с фрагментом ФВ, дополнительно связан со вторым гетерологичным компонентом. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ, связанный или взаимодействующий с белком Ф VIII, связан или сшит с первым гетерологичным компонентом, а белок Ф VIII дополнительно связан со вторым гетерологичным компонентом. В определенных вариантах реализации изобретения первая полипептидная цепь, содержащая фрагмент ФВ и первый гетерологичный компонент, и вторая полипептидная цепь, содержащая белок Ф VIII и второй гетерологичный компонент, соединены друг с другом таким образом, что это соединение не дает возможности белку Ф VIII взаимодействовать с другими компонентами, например эндогенным ФВ. В одном варианте реализации изобретения соединение представляет собой ковалентную связь, например дисульфидную связь.

Как фрагмент ФВ, так и белок Ф VIII могут быть соединены или связаны с первым или вторым гетерологичным компонентом посредством линкера, например отщепляемого линкера, например тромбин-отщепляемого линкера. Линкер между фрагментом ФВ и первым гетерологичным компонентом может обозначаться в данном тексте как ФВ-линкер. Линкер между белком Ф VIII и вторым гетерологичным компонентом может обозначаться в данном тексте как Ф VIII-линкер. Либо оба компонента - фрагмент ФВ и белок Ф VIII могут быть соединены или связаны с первым или вторым гетерологичным компонен-

том посредством линкера, например отщепляемого линкера, например тромбин-отщепляемого линкера. В определенных вариантах реализации изобретения первый гетерологичный компонент, связанный с фрагментом ФВ, содержит полипептидный, неполипептидный компонент либо оба. Неограничивающие примеры первого гетерологичного полипептидного компонента включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент либо две или более комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производное или вариант или любые комбинации этих компонентов. В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный компонент, связанный с белком Ф VIII, содержит полипептидный, неполипептидный компонент либо оба. Неограничивающие примеры второго гетерологичного компонента включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, либо две или более комбинации этих компонентов. Неограничивающие примеры неполипептидного компонента включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производное или вариант или любые комбинации этих компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ присоединен к Ф VIII при помощи опосредованного сортазой *in vitro* лигирования белка. В некоторых вариантах реализации изобретения применяется распознавающий сортазу мотив.

В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент является константной областью иммуноглобулина или ее частью. В конкретном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент является первой Fc-областью. В некоторых вариантах реализации изобретения второй гетерологичный компонент является константной областью иммуноглобулина или ее частью. В конкретном варианте реализации изобретения второй гетерологичный компонент является второй Fc-областью. В конкретном варианте реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и белок Ф VIII, при этом фрагмент ФВ связан с константной областью иммуноглобулина или ее частью, которая является Fc-областью. В другом варианте реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и белок Ф VIII, при этом белок Ф VIII связан с константной областью иммуноглобулина или ее частью, которая является Fc-областью. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и белок Ф VIII связан с первой с константной областью иммуноглобулина, которая является первой Fc-областью, а белок Ф VIII связан со второй константной областью иммуноглобулина, которая является второй Fc-областью, и при этом фрагмент ФВ и белок Ф VIII связаны или взаимодействуют друг с другом посредством нековалентной связи, либо первая Fc-область и вторая Fc-область соединены друг с другом посредством ковалентной связи. В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ, связанный с первым гетерологичным компонентом, дополнительно связан со вторым гетерологичным компонентом, например второй Fc-областью, посредством линкера, например процессируемого линкера. В одном аспекте реализации фрагмент ФВ связан с первым гетерологичным компонентом посредством линкера, например ФВ-линкера, например отщепляемого линкера. В другом аспекте реализации белок Ф VIII связан со вторым гетерологичным компонентом посредством линкера, например Ф VIII-линкера, например отщепляемого линкера. Неограничивающие примеры гетерологичных компонентов раскрыты в другом месте данного текста. В некоторых вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом настоящего изобретения, содержит, в значительной степени описывается из или описывается формулой, выбранной из группы, состоящей из

- (a) V-L1-H1-L3-C-L2-H2,
- (b) H2-L2-C-L3-H1-L1-V,
- (c) C-L2-H2-L3-V-L1-H1,
- (d) H1-L1-V-L3-H2-L2-C,
- (e) H1-L1-V-L3-C-L2-H2,
- (g) H2-L2-C-L3-V-L1-H1,
- (g) V-L1-H1-L3-H2-L2-C,
- (g) C-L2-H2-L3-H1-L1-V,
- (i) H2-L3-H1-L1-V-L2-C,
- (j) C-L2-V-L1-H1-L3-H2,
- (k) V-L2-C-L1-H1-L3-H2,
- (l) H2-L3-H1-L1-C-L2-V,

где V является описанным в данном тексте фрагментом ФВ;

каждый из L1 или L2 является произвольным линкером, например отщепляемым линкером, например тромбин-отщепляемым линкером;

L3 является произвольным линкером, например оцFc линкером, например процессируемым линкером;

каждый из H1 или H2 является произвольным гетерологичным компонентом;

С является белком Ф VIII;

(-) представляет пептидную связь либо одну или более аминокислот.

В других аспектах химерный белок, являющийся объектом изобретения, содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из

- (m) V-L1-H1:H2-L2-C,
- (n) V-L1-H1:C-L2-H2;
- (o) H1-L1-V:H2-L2-C;
- (p) H1-L1-V:C-L2-H2;
- (q) V:C-L1-H1:H2;
- (r) V:H1-L1-C:H2;
- (s) H2:H1-L1-C:V,
- (t) C:V-L1-H1:H2 и
- (u) C:H1-L1-V:H2,

где V является описанным в данном тексте фрагментом ФВ;

каждый из L1 или L2 является произвольным линкером, например тромбин-отщепляемым линкером;

каждый из H1 или H2 является произвольным гетерологичным компонентом;

(-) представляет пептидную связь либо одну или более аминокислот;

С является белком Ф VIII; и

(:) представляет химическое или физическое соединение между H1 и H2.

В одном варианте реализации изобретения один или более гетерологичных компонентов являются соединениями, продлевающими время полужизни. Соединения, продлевающие время полужизни, известны в данной области техники, а неограничивающие примеры таких продлевающих время полужизни соединений включают константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, производное либо вариант или две или более комбинации этих компонентов. Неполипептидный компонент может содержать полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), производное или любые комбинации этих компонентов.

В одном варианте реализации изобретения (:) в формулах от (n) до (x) представляет химическое соединение, например по меньшей мере одну непептидную связь. В определенных вариантах реализации изобретения химическое соединение, т.е. (:), является ковалентной связью. В других вариантах реализации изобретения соединение, т.е. (:), является нековалентным взаимодействием, например ионным взаимодействием, гидрофобным взаимодействием, гидрофильным взаимодействием, Ван-дер-Ваальсовским взаимодействием, водородной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) является непептидной ковалентной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) является пептидной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) в формулах от (n) до (x) представляет физическое соединение между двумя последовательностями, при этом часть первой последовательности находится в непосредственной близости ко второй последовательности так, что первая последовательность защищает или блокирует часть второй последовательности от взаимодействия с другим компонентом, и дополнительно к этому данное физическое соединение поддерживается таким образом, что не дает возможности второй последовательности взаимодействовать с другими компонентами.

Формулы (a)-(x) включены в данный текст в качестве неограничивающих примеров конструкций, являющихся объектами настоящего изобретения. Ориентация формул полипептидов идет от N-конца (слева) до C-конца (справа). Например, формула V-L1-H1-L3-C-L2-H2 означает формулу NH2-V-L1-H1-L3-C-L2-H2-COOH. Дополнительно (:) может являться соединением или взаимодействием между двумя полипептидными цепями посредством ковалентной связи или нековалентной связи между любой частью первой цепи и любой частью второй цепи, если не указано иное. Например, формула V-H1:H2-C содержит две полипептидные цепи, первую цепь представляет V-H1, а вторую цепь представляет C-H2, при этом V из первой цепи взаимодействует или соединено с C из второй цепи и/или H1 из первой цепи взаимодействует или соединено с H2 C из второй цепи. В других некоторых реализации изобретения (:) обозначает ковалентную, непептидную связь или нековалентную связь.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок содержит, в значительной степени описывается из или описывается формулой, выбранной из группы, состоящей из

- | | | | |
|------|---|------|-----------------------------|
| (1) | V:C, | (2) | H-V:C or C:V-H, |
| (3) | V:C-H or H-C:V, | (4) | V-H1:H2-C or H1-V:C-H2, |
| (5) | V:C-H1:H2 or H2:H1-C:V, | (6) | H2:H1-V:C or C:V-H1:H2, |
| (7) | H-L-V:C or C:V-L-H, | (8) | V:C-L-H or H-L-C:V, |
| (9) | V-C or C-V, | (10) | H-V-C or C-V-H, |
| (11) | V-H-C or C-H-V, | (12) | V-C-H or H-C-V, |
| (13) | V-H1-C-H2 or H2-C-H1-V, | (14) | H1-V-C-H2 or H2-C-V-H1, |
| (15) | H1-V-H2-C or C-H2-V-H1, | (16) | V-H1-H2-C or C-H2-H1-V, |
| (17) | V-L-C or C-L-V, | (18) | H-L-V-C or C-V-L-H, |
| (19) | H-V-L-C or C-L-V-H, | (20) | V-L-H-C or C-H-L-V, |
| (21) | V-H-L-C or C-L-H-V, | (22) | V-L-C-H or H-C-L-V, |
| (23) | V-C-L-H or H-L-C-V, | (24) | H-L1-V-L2-C or C-L2-V-L1-H, |
| (25) | V-L-H1:H2-C or C-H2:H1-L-V, | | |
| (26) | V-H1:H2-L-C or C-L-H2:H1-V, | | |
| (27) | V:C-H1-H2 or H2-H1-C:V, | | |
| (28) | H2-H1-V:C or C:V-H1-H2, | | |
| (29) | V:C-L-H1:H2 or H2:H1-L-C:V, | | |
| (30) | H2:H1-L-V:C or C:V-L-H1:H2, | | |
| (31) | V-L1-H1:H2-L2-C or L-L2-H2:H1-L1-V, | | |
| (32) | V:C-L-H1-H2 or H2-H1-L-C:V, | | |
| (33) | V:C-H1-L-H2 or H2-L-H1-C:V, | | |
| (34) | V:C-L1-H1-L2-H2 or H2-L2-H1-L1-C:V, | | |
| (35) | H2-H1-V:C or C:V-H1-H2, | | |
| (36) | H2-H1-L-V:C or C:V-L-H1-H2, | | |
| (37) | H2-L-H1-V:C or C:V-H1-L-H2, | | |
| (38) | H2-L2-H1-L1-V:C or C:V-L1-H1-L2-H2, | | |
| (39) | V-L1-H-L2-C or C-L2-H-L1-V, | | |
| (40) | V-L1-C-L2-H or H-L2-C-L1-V, | | |
| (41) | V-L-H1-C-H2 or H2-C-H1-L-V, | | |
| (42) | V-H1-C-L-H2 or H2-L-C-H1-V, | | |
| (43) | V-H1-L-C-H2 or H2-C-L-H1-V, | | |
| (44) | H1-L-V-C-H2 or H2-C-V-L-H1, | | |
| (45) | H1-V-L-C-H2 or H2-C-L-V-H1, | | |
| (46) | H1-V-C-L-H or H-L-C-V-H1, | | |
| (47) | H1-L-V-H2-C or C-H2-V-L-H1, | | |
| (48) | H1-V-L-H2-C or C-H2-L-V-H1, | | |
| (49) | H1-V-H2-L-C or C-L-H2-V-H1, | | |
| (50) | V-L-H1-H2-C or C-H2-H1-L-V, | | |
| (51) | V-H1-L-H2-C or C-H2-L-H1-V, | | |
| (52) | V-H1-H2-L-C or C-L-H2-H1-V, | | |
| (53) | V-L1-H1-L2-C-H2 or H2-C-L2-H1-L1-V, | | |
| (54) | V-L1-H1-C-L2-H2 or H2-L2-C-H1-L1-V, | | |
| (55) | V-L1-H1-L2-C-L3-H2 or H2-L3-C-L2-H1-L1-V, | | |

- (56) V-H1-L1-C-L2-H2 or H2-L2-C-L1-H1-V,
- (57) H1-L1-V-L2-C-H2 or H2-C-L2-V-L1-H1,
- (58) H1-L1-V-C-L2-H2 or H2-L2-C-V-L1-H1,
- (59) H1-L1-V-L2-C-L3-H2 or H2-L3-C-L2-V-L1-H1,
- (60) H1-V-L1-C-L2-H2 or H2-L2-C-L1-V-H1,
- (61) H1-L1-V-L2-H2-C or C-H2-L2-V-L1-H1,
- (62) H1-L1-V-H2-L2-C or C-L2-H2-V-L1-H1,
- (63) H1-L1-V-L2-H2-L3-C or C-L3-H2-L2-V-L1-H1,
- (64) H1-V-L1-H2-L2-C or C-L2-H2-L1-V-H1,
- (65) V-L1-H1-L2-H2-C or C-H2-L2-H1-L1-V,
- (66) V-L1-H1-H2-L2-C or C-L2-H2-H1-L1-V,
- (67) V-L1-H1-L2-H2-L3-C or C-L3-H2-L2-H1-L1-V, и
- (68) V-H1-L1-H2-L2-C or C-L2-H2-L1-H1-V,

V является описанным в данном тексте фрагментом ФВ;

С является белком Ф VIII;

H1 или H2 является гетерологичным компонентом или первым гетерологичным компонентом;

H2 является вторым гетерологичным компонентом; первый гетерологичный компонент и второй гетерологичный компонент могут быть одинаковыми или разными;

каждый из L, L1 или L2 является произвольным линкером;

(-) представляет пептидную связь либо одну или более аминокислот;

(:) представляет химическое или физическое соединение.

Линкеры могут быть одинаковыми или разными, и каждый может являться отщепляемым линкером, содержащим один или более сайтов расщепления ферментами. Гетерологичные компоненты могут представлять известную в данной области техники технологию и являться полипептидом, неполипептидными компонентами или обоими этими компонентами. Полипептидный компонент может содержать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, любые их производные либо варианты или любые комбинации этих компонентов (например, Fc-область). Неполипептидный компонент может содержать полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), их производное либо вариант или любые комбинации этих компонентов. Каждый из H, H1 или H2 может быть выбран отдельно на основе своих характеристик, и эти компоненты могут все быть одинаковыми или разными. Неограничивающие примеры гетерологичных компонентов раскрыты в другом месте данного текста. Формулы (1)-(68) включены в данный текст в качестве неограничивающих примеров конструкций, являющихся объектами настоящего изобретения.

В одном варианте реализации изобретения (:) представляет химическое соединение, например по меньшей мере одну непептидную связь. В определенных вариантах реализации изобретения химическое соединение, т.е. (:), является ковалентной связью. В других вариантах реализации изобретения соединение, т.е. (:), является нековалентным взаимодействием, например ионным взаимодействием, гидрофобным взаимодействием, гидрофильным взаимодействием, Ван-дер-Ваальсовским взаимодействием, водородной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) является непептидной ковалентной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) является пептидной связью. В других вариантах реализации изобретения (:) представляет физическое соединение между двумя последовательностями, при этом часть первой последовательности находится в непосредственной близости ко второй последовательности так, что первая последовательность защищает или блокирует часть второй последовательности от взаимодействия с другим компонентом, и дополнительно к этому данное физическое соединение поддерживается таким образом, что не дает возможности второй последовательности взаимодействовать с другими компонентами.

В одном варианте реализации изобретения первый гетерологичный компонент (H или H1), связанный с фрагментом ФВ в химерном белке, является первой Fc-областью. В другом варианте реализации изобретения второй гетерологичный компонент (или H2), связанный с белком Ф VIII в химерном белке, является второй Fc-областью.

В определенных вариантах изобретения химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит две полипептидные цепи, с первой цепью, содержащей, состоящей преимущественно из или состоящей из аминокислотной последовательности, кодирующей Ф VIII (например, одноцепочечный Ф VIII), и первого гетерологичного компонента (например, первой Fc-области), и второй цепью, содержащей, состоящей преимущественно из или состоящей из аминокислотной последовательности, кодирующей фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3, второго гетерологичного компонента (например, второй Fc-области) и линкера между фрагментом ФВ и вторым Fc-доменом (например, ФВ-

линкера). Линкер между фрагментом ФВ и вторым Fc-доменом может являться тромбин-отщепляемым линкером. В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный белок Ф VIII содержит третий гетерологичный компонент, например продлевающий время полужизни компонент, который связан с N-концом, C-концом или одним или более участками в составе последовательности Ф VIII.

В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит три полипептидные цепи, при этом первая цепь содержит, состоит преимущественно из или состоит из тяжелой цепи Ф VIII, вторая цепь, содержит, состоит преимущественно из или состоит из легкой цепи Ф VIII, сшитой с первым гетерологичным компонентом (например, первой Fc-областью), и третья полипептидная цепь содержит, состоит преимущественно из или состоит из фрагмента ФВ, содержащего домен D' и домен D3, второго гетерологичного компонента (например, второй Fc-области) и линкера. Линкер между фрагментом ФВ и вторым гетерологичным компонентом может являться тромбин-отщепляемым линкером. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь Ф VIII связана с третьим гетерологичным компонентом, например продлевающим время полужизни компонентом, который может быть связан с N-концом, C-концом или одним или более участками в составе последовательности Ф VIII.

В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит две полипептидные цепи с первой цепью, содержащей, состоящей преимущественно из или состоящей из тяжелой цепи Ф VIII, и второй цепью, содержащей, состоящей преимущественно из или состоящей из легкой цепи Ф VIII, первого гетерологичного компонента (например, первой Fc-области), первого линкера (например, сайта расщепления протеазой, содержащего один или более сайтов внутриклеточного процессинга), фрагмента ФВ, второго линкера (например, тромбин-отщепляемого линкера) и второго гетерологичного компонента (например, второй Fc-области), при этом легкая цепь Ф VIII связана с первым гетерологичным компонентом (например, первой Fc-областью), который дополнительно связан с фрагментом ФВ посредством первого линкера (например, процессируемого линкера, содержащего сайт расщепления протеазой, содержащего один или более сайтов внутриклеточного процессинга), а фрагмент ФВ связан со второй Fc-областью посредством второго линкера (например, тромбин-отщепляемого линкера). В определенных вариантах реализации изобретения первый линкер и второй линкер являются идентичными либо разными.

В определенных вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит одну полипептидную цепь, которая содержит одноцепочечный белок Ф VIII, первый гетерологичный компонент (например, первую Fc-область), первый линкер (например, тромбин-отщепляемый линкер), фрагмент ФВ, второй линкер (например, тромбин-отщепляемый линкер) и второй гетерологичный компонент (например, вторую Fc-область), при этом одноцепочечный белок Ф VIII связан с первым гетерологичным компонентом, который дополнительно связан с фрагментом ФВ посредством первого линкера, а фрагмент ФВ связан со второй Fc-областью посредством второго линкера. В одном варианте реализации изобретения первый линкер является отщепляемым линкером, содержащим первый сайт расщепления и второй сайт расщепления. В другом варианте реализации изобретения второй линкер является отщепляемым линкером, содержащим один или два сайта расщепления. В конкретном варианте реализации изобретения второй линкер является тромбин-отщепляемым линкером. Линкер, применяемый в данном изобретении, может иметь любую длину, например по меньшей мере 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 или 700 аминокислот. Например, линкер может состоять из 20 аминокислот, 35 аминокислот, 42 аминокислот, 73 аминокислот или 98 аминокислот.

В определенных вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ напрямую связан с белком Ф VIII посредством пептидной связи или линкера. В качестве одного из способов связывания фрагмента ФВ и белка Ф VIII напрямую или посредством линкера может применяться ферментативное лигирование (например, с участием сортазы). Например, сортаза относится к группе прокариотических ферментов, которые модифицируют поверхностные белки путем распознавания и расщепления карбоксил-терминального сортировочного сигнала. Для большинства субстратов ферментов сортазы распознавающий сигнал состоит из мотива LPXTG (Leu-Pro-любая аминокислота-Thr-Gly) (SEQ ID NO: 106), затем идет высокогидрофобная трансмембранныя последовательность, затем кластер из основных остатков, таких как аргинин. Расщепление происходит между Thr и Gly с временным присоединением через остаток Thr к Cys остатку активного участка лигационного партнера, затем следует транспептидация, во время которой белок ковалентно присоединяется к стенке клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения лигационный партнер содержит Gly(n).

В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ, связанный с распознавающим сортазу мотивом посредством произвольного линкера, может быть сшит с белком Ф VIII, связанным сортазой с Gly(n), при этом n может иметь любое численное значение. Лигационная конструкция содержит фрагмент ФВ (N-концевая часть конструкции) и белок Ф VIII (C-концевая часть конструкции), при этом между ними вставлен распознавающий сортазу мотив. Пример конструкции показан на фиг. 24(А). Другая лигационная конструкция содержит фрагмент ФВ (N-концевая часть конструкции), линкер, распознавающий сортазу мотив и белок Ф VIII (C-концевая часть конструкции) (например, фиг. 24(Б)). В другом варианте реализации изобретения белок Ф VIII, связанный с распознавающим сортазу мотивом посредством произ-

вольного линкера, может быть сшит с фрагментом ФВ, связанным сортазой с Gly(n), при этом n может иметь любое численное значение. Полученная лигационная конструкция содержит белок Ф VIII (N-концевая часть конструкции) и фрагмент ФВ (C-концевая часть конструкции), при этом между ними вставлен распознающий сортазу мотив. Пример конструкции показан на фиг. 24(Б). Другая лигационная конструкция содержит белок Ф VIII (N-концевая часть конструкции), линкер, распознающий сортазу мотив и фрагмент ФВ (C-концевая часть конструкции) (например, фиг. 24(Г)). В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ, связанный с распознающим сортазу мотивом посредством первого произвольного линкера, может быть сшит с гетерологичным компонентом, например, константной областью иммуноглобулина или ее частью, например Fc-областью, связанной с сайтом расщепления тромбином посредством второго произвольного линкера. Полученная конструкция может содержать фрагмент ФВ (N-концевая часть), первый линкер, распознающий сортазу мотив, сайт расщепления протеазой, второй произвольный линкер и гетерологичный компонент (например, фиг. 24(Д)). В определенных вариантах реализации изобретения эта полученная конструкция является частью химерного белка, содержащего белок Ф VIII и второй гетерологичный компонент, например константную область иммуноглобулина или ее часть, например Fc-область. В другом примере химерный белок содержит три полипептидные цепи, с первой цепью, содержащей фрагмент ФВ, первый линкер, распознающий сортазу мотив, сайт расщепления протеазой, второй произвольный линкер, первый гетерологичный компонент, второй цепью, содержащей легкую цепь белка Ф VIII и второй гетерологичный компонент, и третьей цепью, содержащей тяжелую цепь белка Ф VIII.

В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, причем фрагмент ФВ и белок Ф VIII ковалентно соединены друг с другом либо ковалентно связаны друг с другом, обладает меньшей иммуногенностью чем белок Ф VIII без фрагмента ФВ. Сниженная иммуногенность включает, но не ограничивается этим, более слабый гуморальный иммунный ответ, например более низкий титр нейтрализующих антител, или более слабый клеточно-опосредованный иммунный ответ на Ф VIII, например меньшую выработку различных цитокинов.

В других вариантах реализации результатом данного изобретения было продление времени полужизни белка Ф VIII (либо химерного белка) по сравнению с белком Ф VIII без фрагмента ФВ или Ф VIII дикого типа. Время полужизни белка Ф VIII по меньшей мере в 1,5 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 11 раз или по меньшей мере в 12 раз больше, чем время полужизни белка Ф VIII без фрагмента ФВ. В одном варианте реализации изобретения время полужизни Ф VIII приблизительно 1,5-20-кратно, приблизительно 1,5-15-кратно или приблизительно 1,5-10-кратно превышает время полужизни Ф VIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения время полужизни Ф VIII продлено в от около 2 до около 10 раз, от около 2 до около 9 раз, от около 2 до около 8 раз, от около 2 до около 7 раз, от около 2 до около 6 раз, от около 2 до около 5 раз, от около 2 до около 4 раз, от около 2 до около 3 раз, от около 2,5 до около 10 раз, от около 2,5 до около 9 раз, от около 2,5 до около 8 раз, от около 2,5 до около 7 раз, от около 2,5 до около 6 раз, от около 2,5 до около 5 раз, от около 2,5 до около 4 раз, от около 2,5 до около 3 раз, от около 3 до около 10 раз, от около 3 до около 9 раз, от около 3 до около 8 раз, от около 3 до около 7 раз, от около 3 до около 6 раз, от около 3 до около 5 раз, от около 3 до около 4 раз, от около 4 до около 6 раз, от около 5 до около 7 раз или от около 6 до около 8 раз по сравнению с Ф VIII дикого типа или белком Ф VIII без фрагмента ФВ. В других вариантах реализации изобретения время полужизни Ф VIII составляет 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 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч. В других вариантах реализации изобретения время полужизни Ф VIII составляет от около 15 ч до около двух недель, от около 16 ч до около одной недели, от около 17 ч до около одной недели, от около 18 ч до около одной недели, от около 19 ч до около одной недели, от около 20 ч до около одной недели, от около 21 ч до около одной недели, от около 22 ч до около одной недели, от около 23 ч до около одной недели, от около 24 ч до около одной недели, от около 36 ч до около одной недели, от около 48 ч до около одной недели, от около 60 ч до около одной недели, от около 24 ч до около шести дней, от около 24 ч до около пяти дней, от около 24 ч до около четырех дней, от около 24 ч до около трех дней или от около 24 ч до около двух дней.

В некоторых вариантах реализации изобретения среднее время полужизни Ф VIII у пациента составляет около 15 ч, около 16 ч, около 17 ч, около 18 ч, около 19 ч, около 20 ч, около 21 ч, около 22 ч, около 23 ч, около 24 ч (1 дня), около 25 ч, около 26 ч, около 27 ч, около 28 ч, около 29 ч, около 30 ч, око-

ло 31 ч, около 32 ч, около 33 ч, около 34 ч, около 35 ч, около 36 ч, около 40 ч, около 44 ч, около 48 ч (2 дней), около 54 ч, около 60 ч, около 72 ч (3 дней), около 84 ч, около 96 ч (4 дней), около 108 ч, около 120 ч (5 дней), около шести дней, около семи дней (одной недели), около восьми дней, около девяти дней, около 10 дней, около 11 дней, около 12 дней, около 13 дней или около 14 дней.

В определенных вариантах реализации изобретения время полужизни белка Ф VIII, ковалентно связанный с фрагментом ФВ, было продлено в случае мышей с двойным Ф VIII/ФВ генным нокатутом ("ДГН") по сравнению с полипептидом, состоящим из Ф VIII или мономер-димерного гибрида Ф VIII.

А) Фрагменты фактора Виллебранда (ФВ).

ФВ (также известный как Ф8ФВ) является крупным мультимерным гликопротеином, который находится в плазме крови и постоянно вырабатывается в эндотелии (в тельцах Вейбеля-Палада), мегакариоцитах (α-гранулах тромбоцитов) и субэндотелиальной соединительной ткани. Основной мономер ФВ представляет собой белок из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит определенное количество специфических доменов со специфическими функциями, домены D' и D3 (которые совместно связываются с фактором VIII), домен A1 (который связывается с тромбоцитарным GPIb-рецептором, гепарином и/или, возможно, коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с тромбоцитарным интегрином αIIbβ3, когда он находится в активированном состоянии) и "цистеин-узловой" домен у C-терминального конца белка (который ФВ делит с тромбоцитарным фактором роста (PDGF), трансформирующим фактором роста β (TGFβ) и β-человеческим хорионическим гонадотропином (βХГЧ)).

Состоящая из 2813 аминокислот последовательность человеческого ФВ представлена в Genbank как Accession Number NP_000543.2. Нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий ФВ, представлена в Genbank как Accession Number NM_000552.3. Нуклеотидная последовательность человеческого ФВ обозначена как SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 1. Каждый из доменов ФВ перечислен в табл. 1.

Таблица 1

Домены ФВ	Аминокислотная последовательность	
Сигнальный пептид ФВ (Аминокислоты от 1 до 22 из SEQIDNO: 2)	1	<u>MTPARFAGVL LALALITLPGT LC</u> 22
D1D2 участок ФВ (Аминокислоты от 23 до 763 из SEQIDNO: 2)	23	<u>AEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNFTFDGSM</u> 51 YSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEEFFDIHLFVNG 101 TVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGVVARIDGSGNFQVLL 151 SDRYFNKTCGLCGNPNFNAEEDDFMTQEGTILTSDPYDFANSWALSSGEQWC 201 ERASPPSSSCNISSGEMOKGLWEQCOLLKSTSFSFARCHPLVDPEFFVALC 251 EKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSSACSPVCPAGME 301 YRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCEPGQLLDEGLCVESTECPC 351 VHSGKRYPPGTSLSRDCNTC1CRNSWQICSNEECPGECILVTCQSHFKSFID 401 NRYTTFSGICQYLLARDCQDHSTFSIVIETVQCADDRDAVCTRSVTVRLEG 451 LHNLSLVKLKHGAGVAMDGQDQLPLKGLDRIQHTVTASVRLSYYGDLQM 501 DWDGRGRLLVTKLVSPLVAGKTCGLCGNNGNQGDDFLTPSGLAEPRVDEFG 551 NAWKLHGDQDLQKQHSDPCALNPRTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVS 601 PLPYLRLNCRYDVVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRRGVRAVREPGRCEL 651 NCPKGQVYLQCGTFCNLTCRSLSYDPEECEACLEGCFCPGELYMDERGD 701 CVPKAQCPCYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLED 751 <u>AVLSSPLSHRSKR763</u>
Домен D' ФВ (Аминокислоты от 764 до 866 из SEQIDNO: 2)	764	<u>SLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTK</u> <u>TCQNYDLEM</u> 801 <u>SMGCVSGCLCPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCV</u> 851 <u>CRDRKWNCTD HVCDAT866</u>
Домен D3 ФВ (Аминокислоты от 867 до 1240 из SEQIDNO: 2)	867	<u>CSTIGMAHYLTDFGLKYLFPGEQXYLVQDYCGS</u> 901 <u>NP GTFRILVGNKGCSHESVKCKRVTIILVEGGIEIELFDFGEVNVKRPKMDE</u> 951 <u>THFEVVESEGRYIILLLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGILCGNFD</u> 1001 <u>GIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFFGNSWVSSQCADTRKVPFLSSPATICHHNI</u> 1051 <u>MKQTMVDSSCRILTSDFVQDCNKLVDPEPYLDCVCIYDTCSEESIGDCAF</u> 1101 <u>CDTIAAYAHVCAQHGKVVTWTRATLCPQSCCEERNLRENGYECEWRVNSCA</u> 1151 <u>FACCVTCQHPEPLACFVOCVEGGCHANCPGKILDELLTICVDPEDCPVCE</u> 1201 <u>VAGRRAFASGKVTILNPSPDEHCQICHDVNVNLTCEACQEP</u> 1240
Домен A1 ФВ (Аминокислоты от 1241 до 1479 из SEQIDNO: 2)	1241	GGLVVPPDTA 1251 PVSPFTLIVVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEEFVLKAFV 1301 VDMMERLRISQKWRVVAVVEYHDGHAYIGLKDKRKPSELRRRIASQVYK 1351 GSQVASTSEVLKYTLQIFSKIDPRAESRIALLMASQEPQRMSRNFVRY 1401 VQGLKKKKVTVIPVGIGPHANLQIRLIEKQAPENKAFLVSSVDELEQQR 1451 DEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQTVG 1479
	1480	PGLLGVSTLGPKRNSMVLDA
	1501	FVLEGSDKIGEADFNRSKFEMEEVQMDVGQDSIHVTVLQYSYMTVVEY
	1551	PFSEAQSKGDIQLQRVRREIYRQGGNRTNTGLALRYSLHSFLVSGDREQA
	1600	1600
	1601	PNLVYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGPANVQELERIGWPNAPIL
	1651	IQDFETLIPREAPDVLVLRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQQPLDVILLLDGSS
	1701	SFPASYFDEMKSFAKIFSKANIGPRLTQSVLQYGSITTTIDVWPWNVVF
	1751	KAHLLSLVDMQREGGFSQIGDALGFAVRLTSEMHGARGPASKAVLIV
	1801	TDVSVDSDVAAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAALRILAGPAGDSNVK
	1851	LQRIEDELPMTVLGNFLHKLCSGFVRICMDEDGNEKRPGDWVTLPDQCH
	1901	TTTCQPDGQTLKSHRVNCDRGLRPSCPNSQSPVKEETCGCRWTCPVC

	1951	TGSSTRHIVTFDGQNFKLTGSCSYVLFQNKEDQLEVIHLHNGACSPGARQG
	2001	CMKSIEVKHSALESVEXHSDEVTVNGLRVSPVYVGGNMEVNYYGAIMHEV
	2051	RFNHHLGHIFTFTPQNNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFMLRD
	2101	GTVTITDWTKLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHCQVLLPLFAEC
	2151	HKVLAPATFYAICQCDSCHQEVQCEVIA5YAHLCRTNGVCVDWRTPDFFCA
	2201	MSCPSSLVYNNHCEHGGCPFRHCDGNVSSCGDHPSEGCFCPPDKVMLEGSCVP
	2251	EEACTQCGEDGVQHQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCTTQPCTAK
	2301	APTCGLCEVARLQRQNAQDQCCPEYECVCDVFSCDLFPVPHCERGLQPTLHN
	2351	PGECRPNFTCACRKEECKRVSPPSCCPHRLPLRKTQCCDEYEACACNVN
	2401	STVSCPLGYLASTATNDCGCTTTCLPDKVCVHRSTIYFVGQFWEEGCDV
	2451	CTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSRGFTYVLHEGECGRCLPSACE
	2501	VVTGSPRGDSQSSWKSVGSQWASPEPCLINECVRKVEEVFIQQRNVSCP
	2551	QLEVFPVCPSPGQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNTVIGPGKTVMDVC
	2601	TTCRMVQGVV1SGFKLECRKTTNCPCPLGYKEENNTEGCCGRCLPTACT
	2651	IQLRGGQ1M1LKRDETLQDGCL1HFKVNERGEYFWEKRVTCGPPFDEHK
	2701	CLAEGGKIMKIPGTCCTDEEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEDIHYC
	2751	QGKCASTKAMY51DNDVQDQCSCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLN
	2801	AMECKCSPRK CSK
	Нуклеотидная последовательность	
Полноразмерный ФВ (SEQIDNO: 1)	ATGATTCTGCAGATTGGCGGGTGTGTTCTGGCCCTCATTTGCCAGGGACCCCTTTGTC AGAAGGAATCAGGGCAGGTCTACCGGG TACTAACGGCTAAACCGGCCCCAACGAGAACAGGGAGTAAACCGGCCCTGGGAAACAG TCTTCTTGAAGCCGGCTCAAGTAGGGCC GATGAGCTTTTCGAAGTGAATCTGTCACACACCTTGATGGGAGCATGTACAGCTTGCGGGATAC TGCAGTTACCTCTGGAGCTGGCCATGGGGCTGCGAGA CTACAGGAAACGGCTTCACTGAAGCATGGTGGAAACTACCCCTGTACATGTGCGAAACGCCATATG ACGTCATGGAGGACGGTCCCCGAGGTCTT ACGCTCTTCTGCATTATTGGGACTCTCCAGAACATGGCAAGAGAGTGGAGCTCTCGGTATCTTGGG AATTTCCTGACATCCATTATGGGACTCTCCAGAACATGGCAAGAGAGTGGAGCTCTCGGTATCTTGGG TGCAGGAAGAGCTTAACACCCCTGAAGGGCTTACGGCTCTCACTCGGAGAGGACATAGAACCCC TTAAAAAACTGTAGGTAACAAACAGTACCA ACCGTGACACAGGGGACCAAAGAGTCTCCATGGCCATAGCCTCCAAGGGCTGTATCTAGAAACTGA GGCTGGGACTACTAACAGCTGTCGGTGGAGGCT TGGCACTGTGTCCTGGTCTCAGAGTGAACGGGATACGGGAGTACGGAGGTTCCGACATAGATCTTGA CCGACCCATGATTTGACAGGCACATCCGA ATGGCTTTGGCAGGATCGATGGCAGCGCAACTTCAAGTCCTGCTGAGACAGATACTTCAC AAAGACCTCGGGCTGTGTGGCAACTTTAACAT TACCGAAAACCCGGCTCTAGCTACCGCTGCCGTGAAAGTTCAGGAGCAGACTGTGTATGAAGTTG TCTTGAGCAGCCGACACACCGTTGAATTTGTA CTTCGACTGAAGATGACTTATGACCAAAAGGGACCTTGACCTCGGACCCCTTACGTCTCCGGACACCT CATGGGCTCTGAGCAGTGAAGAACAGTGGT GAACAGACTTCACTGAAAATACTGGGTTCTCCCTGGAAACTGGAGCTGGGAATACTGAAACGGTTGA GTACCCGAGACACTGTCACCTCTGTCACCCACA GAACGGGCACTCCTCCAGCAGCTCATGCAACATCTCTCTGGGGAAATGCGAAGGGCTGTGGGA GCAGTGGCAGCTCTGAAGAGCACCTCGGT CTTGGCCCTGAGGGAGGGTCTGAGTACGTTAGAGGAGACCCCTTACGTCTCCGGACACCT CGTCACTGGTGAAGAGACTTCTGTGGAGGCCACA TTGGCCCTGCAACCTCTGGTGAACCCCGAGGCTTCTGGCCCTGTGTAGAGAGACTTTGTGAG TGTGCTGGGGGGCTGGAGTGGCCTGCGCTCTGC AACGGGGAGACGGGGACCCACTCTGGGAAACACCGGGACACACTCTGTGAAACACACTC ACACGACCCCCGGACCTCACCGGGAGGGAC CCTCTGGAGTACGCCGGACCTGTGCCAGGGAGATGGTGTGTACGGCTGGACCCAGCAGCG CGTGCAGCCCCGGTGTGGCTGTGTAGTGGAG GGAGGACCTCATGGGGCTGGACACGGCTCCCTTACACGACATGCCGACCTGGCTGGTGTGCG GCACACTGGGCAACACGGGACGACATACCTC TATAGGCAGTGTGTGCTCCCTTGCAGGACGGCTGGCAAGGGCTGCACATCAATGAAATGTGTGAGGA GGGATGGCTGGATGGCTGAGCTGGCTGAGG ATATCCGTACACACAGGGGAACGGGGCTCTGGAGGAGACCCAGTGGATCTGCAAGCTGTAGTTACTTACAGCTCT CGTACGACACTACCGACGCTGACGGACTCC GACAGCTCTGGATGAAGGGCTCTGGTGGAGGAGACCCAGTGGCTGGAGCTGTAGTTACTTACAGCTCT TACCTCTGGACACCTCCCTCTCGAGACTG CTGTCGAGGACACTTCCGGAGACGGCACCTCTGTGGCTCACAGGGACGACGCTAAGGGCTTTCGCG ATGGGAGGGGGCTGGAGGGAGAGAGCTGTGAC CAACACCTGCAATTGGCAGAACGGCCAGTGGATCTGCAAGCAATGAAGAATGTCCAGGGAGTGGCTT TCACTGGTCAATCCACTCAAGAGCTTGTAC GTTGTGAGCTAACGGCTTGTGGTCACTTAGACGCTGTACTTCTACAGGTCCCTCACGGAAAC ATGACCACTGGGTTAGGGTGAAGTTCTGCGAAC	

	GTTTGGGGAGAGGCACCAGACCTGGGGTGGACTCGTAGAGGCACCAGGACTCGTCTGTATGGTCC TCTTCACACACCGGACACCCCTAAAGCTA GGCATCAGAACATGACCTCACCAAGCAGAACCTCCAAAGTGGAGGAAGACCCCTGTGGACTTTGGAA CTCTCGAAAGTGAAGTCGCGAGTGTGCTGACA CCCTAGGTCTTAACTGGAGTGGCTCGTGTGGAGGTTCACCTCCCTGGGACACCTGAAACCCCTT GAGGACCTTCACTCGAGCGTCACAGACAGT CCAGAAAAGTGCCTCTGGACTCATCCCCCTGGCCATAACAAACATCATGAAGCAGACGATGGTG GATTCCTCTGTAGAACTTACCAAGTGA GGTCTTTCACGGAGACCTGAGTAGGGGACGGTGGACGGTATTGTTGATGACTCTCGTCTGCTACCC CTAAAGGAGGACATCTTAAAGGAATGGTCACTGCA CTTCCAGGACTGCAACAAGCTGGTGGACCCCGAGCCATATCTGGATGTCTGCATTTACGACACCTGCT CTCTGTGAGTCCATTGGGACTCGCGCTGCTTC ATCTCAGGAGAACGGGTATGAGTGTGAGTGGCCTGATAAACAGCTGTGACCTGCTGCAAGTCACG TGTGAGCAGGACTCGGCTGACGGGACGGGACA TAGAGGCCCCTGCCCCATACTCAACTCACCGGATATTGTCGACACGTTGGACGGAGCTTCA GACAGTGTGGGAGCTGGTGGAGGAGA GCAGTGTGGAGGGCTGCGCATGCCACTGGCCCTGGGAAAATCTGGATGAGCTTTGAGAC GGCTTGACCCGGTGGAGGAGCTGGTGGAG CGTCACACCTCCCGACGGTACGGTGA CGCAACTGAGGACTCTCGACAGGTCACACACT GTGAGCTGGGGGGTTTGCTCAGGAAAGGATC GATTTGGCACTGTGATGTTGCAACCTTCA CAGCTGGGAACTTGGGACT CTAAAGGTAACAGTGGAGTGG GTGAAGGCTGCAAGGAGGGGGAGGGCTGGTGGCTCCACAGATGCCCGGGTGA GCCCTGGGAGACATCTGGGCTGG CACTTCGAGGCTCTCGGCCCTCGGACCCACGGAGGGTGTCTACGGGGCACTGGGGTGA GACATACACCCCTGTAGGGCTTGGCGCAA GCACGATTCTCACTCGACGAGGCTACTGGAC AGGCTGAGTTGGAGGTGAGGCTTGG CGTGTAAAGATGACGTGCTGGCATGACTGG TCCGACTCAAACCTCACGACTTGGGAAA GTGGACATGATGGAGGAGCATCTGGC CGGCTCCACGGCTACATCGGGCTCAAGGAC CACCTGACTACCTGGGCTGAGGGCTTCA GCCAGGGTGGGAGTTAGCGGAGGTCTGG GGAAAGGCACTGGAGGCTGCGGGCAT CACAGGGGAGGCTTGA CCCTGGCTGGAGCTCGACGCCCTAACGG TGGTGGCTCCAGAACCTTATGTTGACAAGG AAATCTCAGCAAGATGACCCCTGGCAG CCCAACGGATGCTGGGACTTTGTC TTAGAAGGTGTTCTGCTGGGGGACTTGG GGGGTGGCTTACAGGGGATGATGGGG GTCCAGGGCTTGA GAGAGAAGGTCATTGATCCGGTGG GCAAGATCGGCTCATCGAGGAGGG CAGGTCCGGACTCTCTCCAGTA GGTCTGGGGACTTGGTGGAG AGAACAAAGGGCTTGGAGGCTGAG CTCTGTTGACCTTGGGGACT TCTTGTGGGGAGGACTCGG GAGACACTGGGAGACTTGGGGAG TACTCTGGCCCGACATGGACA CCAGAGGAACTCCATGGTCTGGATGTGG ATGAGACGGGGGCTGACCTGTT GGTTCTTGGAGGATCCAAAGCTAC TTCTGCTGGAGGATCGG AAGCAGCTTCTGAGCTTAA CCACTAAGTCGCT GCATCCACGTGACGGTGT TCCAAAGGGGACAT CGTAGGGTCA AGGTTTCCCCTGAGGAGCTGGCCAC
--	--

<pre> GGCTGTCGAGGGTGA CGGTCCAGGAGGAATGGTGACAAACGACTTACGGTGTCCAGGACCGAGGT CGGTGTAAGATA CGGTAGACGGTCGCTCTG GGCTTGACTGGAGGACACTGATTTCCTGCTG AACGGTGGTCTCTGTTCACACACTTACGGGAGAATACGGGTGGAGACAGCCTGGTGGCCAGA CGCAACTGACCTCTGTGACTAAAGACAGCA ATGTCATGCCAACATCTCTGTCATCACACACTGTGAGCATGGCTGTCCCGGACTGTGATGGCA CGTGAAGCTCCCTGGGGACCATCTCTCCGAAG TACAGTACGGGTGTTAGAGACAGATGGTGTGACACTCGTACCGCAGGGCCGTGACACTACCGT GCACTCGAGGACACCCCTGGTAAGGGCCTTC GCTGTTCTGCCCTCCAGATAAAAGTCATGTTGGAGGGCAGCTGTGTCCTGAAGAGGCCGACTCAG TGCATTGGTGAAGGATGAGTCAGGACAGCTT CGCAAAAGCAGGGAGGCTTATTCAGTACAACCTTCCCGCAGACAGGACTTCTCCGACATGCCCTCAGCGTAGTC ACGTAACCACTCTCACCTCAGGTGCTGGTCAA CTTGGAAAGCCCTGGGGACCCAGGGCTTGAGATCTGACATGCCCTCAGCGGGGAGAAGGTC ACTCACACACACTGAGCTACTGACACTG TGGCCCGAGTGTGCTCACTGTGAACTGCGGCTCAGGCCACACTGACCAACCCCTGGCGAGTCAGAC AACTTCACCTGCCCTCGAGGAAGGAGGAGT ACGGGGTCAGGGAGTGAACATTGCAACGGGAGCTGGTGTGACTGGTGGGACCGTCACGTCG TTGAAGTGTGAGCCAGTGAAGCTGTGAC CGAGGGTCACACCGACACACTTACATGGCGGGAGGGCTTACGTCTGGTCAAGCAGGGCTCAT ATGAGTATGAGCTGTGCTGCAACTGTGTCAC GTTTCTCAGACAGGGGAGGGGGCTGGCAACACGGGTTCTGGGAGCAGAC TACTCATACACACACTGAGCTACTGACACTG TCCACAGTGTGAGTGGACACCGGCTCAAGACCCCTCCCGACGTACACAGTGGACGTGGCTGTAC CTCTACGGCACTACCCGGAGGGCACCGG GTCTCCAGAACGCTTGTGAGGACAGCTGTGCGTGGCTTCACTTACGGTCTGATGAAGGAGT GGCTGAGGAGGGTCTTACACAAAGGAAAGACGTTCTCTGGCCAGCTGGTGTGACTGGTGGCT GTGGACGGAGGGCTTCCACACAGGGTGG GAAGGACCATTAACCCCTGGGGAGCTTGTGAGGGAG TGTGAGGGCAGCTACAGTCACCCCAAGTAGAGACCTAAGTGTGACCTCAAGTCCCTCTGGT GAGGATGCCGTGATGGCCCTCCCGTGGCCA CTTCAGTGTGAGTGGACACCGGCTCAAGACCCCTCCCGACGTACACAGTGGACGTGGCTGTAC CTCTACGGCACTACCCGGAGGGCACCGG GTCTCCAGAACGCTTGTGAGGAGGGTCTCTGGCCAGCTGGTGTGACTGGTGGGACCGTCACGTCG TTGAAGTGTGAGCCAGTGAAGCTGTGAC CGAGGGACCTTACCCCTGGGGAGCTTGTGAGGGAG TGTGAGGGCAGCTACAGTCACCCCAAGTAGAGACCTAAGTGTGACCTCAAGTCCCTCTGGT GAGCTGGGGGAGCCAAACTGTGTTCTC AAATAACAGGTGAATGTTGGAGAATGTTGCTACGGCTTGACCAATTGAGCTAAGAGGAGGA CAGATCATGACACTGAAGCGTGTGAGACGCT TTTATGTTGCTTACACACCCCTTACAAACAGGATGCGAACGTTGCTGATGTTCTCTCT GTCAGTACTGTGACTCTGCACTCTGCGA CCAGGGTGGCTGACTACTGCAACTTGTGCAAGGCTTAAGTAGAGAGGAGGAGTACTTCTGGGAGAAGAGG TCAACAGGTGCCAACCTTGTGAGAACACAAAG GGTCTACCGGACACTATGAGTGAAGGCTCAGGTACTCTCTCTCATGAGACCCCTTCTCC AGTGTGCGACGGTGGAAACTACTTGTGTC TGTCTGCTGAGGGAGTAAAATTGAAAAATTGCAACCCAGGCTGTGACACATGTGAGGAGGCTGA GTGCAACGACACTGCACTGGCAGGCTGAGT ACAGAACGACTCCCTCATTTAAACTTTAAAGGTCTGAGGAGCAGTGTGACACTCCCTGGACT CACGGTGTGACTGTGAGCTGGCAGCTCAT </pre>
<pre> TCAAGGTGGGAAGCTGTAAGTCTGAGTAGAGGTTGGATATCCACTACTGCCAGGGAAATGTGCCAGC AAAGCCATGACTCTGATTCAGTCAACGAGATG AGTCCACCTCTGACACTTCACTCCACCTTATAGGTGATGCGGTCCTGTTACACGGCTG TTTCGGTACATGAGGTAACCTGAGTTGCTACA GCGAGGACCTGCTCTGCTCGACACGGACAGCAGGAGGCTGTGCTGCTCGGGTACGTCCACCGACCA ATGGCTCTGGTGTGATGCACTAGGGTTCTCAAT CGTCTGGTCACTGGAGGACAGCAGGAGGCTGTGCTGCTCGGGTACGTCCACCGGAGCTGACGGT TACCGGAGACACACATGTTACTCCAAAGGTA GCCATGGAGTCAATGCTCCCGAGGAGCTGAGCAAGT </pre>

Настоящее изобретение относится к фрагменту фактора Виллебранда (ФВ), содержащему домен D' и домен D3 ФВ, отличающемуся тем, что фрагмент ФВ препятствует связыванию эндогенного ФВ (полноразмерного ФВ) с белком Ф VIII. В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ связывается или соединяется с белком Ф VIII. Путем связывания или соединения с белком Ф VIII фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, защищает Ф VIII от расщепления протеазой и активации Ф VIII, стабилизирует тяжелую цепь и легкую цепь Ф VIII и предотвращает выведение Ф VIII фагоцитарными рецепторами. В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ связывается или соединяется с белком Ф VIII и блокирует или предотвращает связывание белка Ф VIII с фосфолипидом и активированым протеином С. Путем предотвращения или подавления связывания белка Ф VIII с эндогенным полноразмерным ФВ фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения снижает выведение Ф VIII клиренс-рецепторами ФВ и, таким образом, продлевает время полужизни Ф VIII. Продление времени полужизни белка Ф VIII происходит, следовательно, благодаря связыванию или соединению фрагмента ФВ, в котором отсутствует участок связывания с клиренс-рецептором ФВ, с белком Ф VIII и экранированию или защите фрагментом ФВ белка Ф VIII от эндогенного ФВ, который содержит участок связывания с клиренс-рецептором ФВ. Наличие белка Ф VIII, связанного или защищенного фрагментом ФВ, также дает возможность рециклирования белка Ф VIII. Следовательно, фрагмент ФВ не может являться полноразмерным зрелым ФВ. Из-за удаления участков связывания клиренс-рецепторов ФВ, содержащихся в полноразмерной молекуле ФВ, гетеродимеры Ф VIII/ФВ, являющиеся объектами данного изобретения, выключаются из процесса выведения ФВ, что позволяет дополнительно продлить время полужизни Ф VIII.

Фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3, может дополнительно содержать домен ФВ, выбранный из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, домена D1, домена D2, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена СК, одного или более их фрагментов или любых их комбинаций. В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ содержит, состоит преимущественно из или состоит из (1) принадлежащих ФВ доменов D' и D3 или их фрагментов; (2) принадлежащих ФВ доменов D1, D' и D3 или их фрагментов; (3) принадлежащих ФВ доменов D2, D' и D3 или их фрагментов; (4) принадлежащих ФВ доменов D1, D2, D' и D3 или их фрагментов; или (5) принадлежащих ФВ доменов D1, D2, D', D3 и A1 или их фрагментов. Описанный в данном тексте фрагмент ФВ не содержит участок, связывающийся с клиренс-рецептором ФВ. В другом варианте реализации изобретения описанный в данном тексте фрагмент ФВ не является аминокислотами от 764 до 1274 из SEQ ID NO: 2. Фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, может содержать любые другие последовательности, связанные или сшитые с фрагментом ФВ, но не являться полноразмерным ФВ. Например, описанный в данном тексте фрагмент ФВ может дополнительно содержать сигнальный пептид.

В одном варианте реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, содержит домен D' и домен D3 ФВ, при этом домен D' является по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотам от 764 до 866 из SEQ ID NO: 2, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII, защищает, подавляет или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII. В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ содержит домен D' и домен D3 ФВ, при этом домен D3 является по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотам от 867 до 1240 из SEQ ID NO: 2, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII, или подавляет, или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения описанный в данном тексте фрагмент ФВ содержит, состоит преимущественно из или состоит из домена D' и домена D3 ФВ, которые являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотам от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII, или подавляет, или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ содержит, состоит преимущественно из или состоит из доменов D1, D2, D', D3 и является по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотам от 23 до 1240 из SEQ ID NO: 2, при этом фрагмент ФВ связывается с белком Ф VIII, или подавляет, или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ дополнительно содержит функционально связанный с ним сигнальный пептид.

В некоторых вариантах реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, состоит преимущественно из или состоит из (1) домена D'D3, домена D1D'D3, домена D2D'D3 или домена D1D2D'D3 и (2) дополнительной последовательности ФВ, содержащей до около 10 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2 до аминокислот от 764 до 1250 из SEQ ID NO: 2), до около 15 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2 до аминокислот от 764 до 1255 из SEQ ID NO: 2), до около 20 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2 до аминокислот от 764 до 1260 из SEQ ID NO: 2), до около 25 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2 до аминокислот от 764 до 1265 из SEQ ID NO: 2) или до около 30 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот от 764 до 1240 из SEQ ID NO: 2 до аминокислот от 764 до 1260 из SEQ ID NO: 2). В конкретном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ, содержащий или состоящий преимущественно из домена D' и домена D3 не представляет собой как аминокислоты от 764 до 1274 из SEQ ID NO: 2, так и полноразмерный зрелый ФВ.

В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ, содержащий домены D'D3, связанные с доменами D1D2, дополнительно содержит внутриклеточный сайт расщепления (например, сайт расщепления PACE или PC5), что делает возможным отщепление доменов D1D2 от доменов D'D3 после экспрессии. Неограничивающие примеры внутриклеточных сайтов расщепления раскрыты в другом месте данного текста.

В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ содержит домен D' и домен D3, но не содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (1) аминокислот от 1241 до 2813 из SEQ ID NO: 2, (2) аминокислот от 1270 до аминокислот 2813 из SEQ ID NO: 2, (3) аминокислот от 1271 до аминокислот 2813 из SEQ ID NO: 2, (4) аминокислот от 1272 до аминокислот 2813 из SEQ ID NO: 2, (5) аминокислот от 1273 до аминокислот 2813 из SEQ ID NO: 2 и (6) аминокислот от 1274 до аминокислот 2813 из SEQ ID NO: 2.

В других вариантах реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, содержит, состоит преимущественно из или состоит из аминокислотной последовательности, соответствующей домену D', домену D3 и домену A1, при этом аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 60, 70, 75 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотам от 764 до 1479 из SEQ ID NO: 2, при этом фрагмент ФВ связывается с Ф VIII. В конкретном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ не представляет собой аминокислоты от 764 до 1274 из SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, со-

держит домен D' и домен D3, но не содержит по меньшей мере один домен ФВ, выбранный из группы, состоящей из (1) домена A1, (2) домена A2, (3) домена A3, (4) домена D4, (5) домена B1, (6) домена B2, (7) домена B3, (8) домена C1, (9) домена C2, (10) домена СК, (11) домена СК и домена С2, (12) домена СК, домена С2 и домена C1, (13) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, (14) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, домена B2, (15) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, домена B2 и домена B1, (16) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1 и домена D4 domain, (17) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4 и домена A3, (18) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3 и домена A2, (19) домена СК, домена С2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3, домена A2 и домена A1 domain, и (20) любых комбинаций этих доменов.

В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ содержит домены D'D3 и один или более доменов или модулей. Примеры таких доменов и модулей включают, но не ограничиваются этим, домены и модули, описанные в работе Zhour et al., Blood, опубликованной онлайн 6 апреля 2012 г.: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134. Например, фрагмент ФВ может содержать домен D'D3 и один или более доменов или модулей, выбранных из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, модуля D4N, модуля VWD4, модуля C8-4, модуля TIL-4, модуля C1, модуля C2, модуля C3, модуля C4, модуля C5, модуля C6 и любых комбинаций этих элементов.

В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ связан с гетерологичным компонентом, при этом гетерологичный компонент связан с N-концом или С-концом фрагмента ФВ либо вставлен между двумя аминокислотами во фрагменте ФВ. Например, инсерционным участком для гетерологичного компонента во фрагменте ФВ может являться домен D', домен D3 либо они оба. Гетерологичный компонент может являться компонентом, продлевающим время полужизни.

В определенных вариантах реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, образует мультимер, например димер, тример, тетramer, пентамер, гексамер, гептамер либо мультимеры высших порядков. В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ является мономером, содержащим только один фрагмент ФВ. В некоторых вариантах реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, может содержать одну или более аминокислотных замен, делеций, присоединений или модификаций. В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ может содержать аминокислотные замены, делеции, присоединения или модификации, которые приводят к тому, что фрагмент ФВ становится неспособным к образованию дисульфидной связи или образованию димера или мультимера. В другом варианте реализации изобретения аминокислотная замена находится в пределах домена D' и домена D3. В конкретном варианте реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену на месте остатка, соответствующего остатку 1099, остатку 1142 или обоим остаткам 1099 и 1142 из SEQ ID NO: 2. По меньшей мере одна аминокислотная замена может представлять собой любые аминокислоты, которые в естественном состоянии не встречаются в ФВ дикого типа. Например, аминокислотная замена может представлять собой любые аминокислоты, кроме цистеина, например изолейцин, аланин, лейцин, аспарагин, лизин, аспарагиновую кислоту, метионин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, треонин, глутамин, триптофан, глицин, валин, пролин, серин, тирозин, аргинин или гистидин. В другом примере аминокислотная замена содержит одну или более аминокислот, которые предотвращают или подавляют образование мультимеров фрагментами ФВ.

В определенных вариантах реализации фрагмент ФВ, применяемый в данном изобретении, может быть дополнительно модифицирован с целью улучшения его взаимодействия с Ф VIII, например улучшения аффинности связывания с Ф VIII. В качестве неограничивающего примера можно привести фрагмент ФВ, который содержит остаток серина на месте остатка, соответствующего аминокислоте 764 из SEQ ID NO: 2, и остаток лизина на месте остатка, соответствующего аминокислоте 773 из SEQ ID NO: 2. Остатки 764 и/или 773 могут влиять на аффинность связывания фрагментов ФВ с Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения фрагмент ФВ может содержать другие модификации, например фрагмент может пэгилированным, гликозилированным, гэкилированным или полисиалинированным.

Б) Гетерологичные компоненты.

Гетерологичный компонент может являться гетерологичным полипептидным или неполипептидным компонентом. В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент является продлевающей время полужизни молекулой, которая известна в данной области техники, и содержит полипептидный компонент, неполипептидный компонент либо комбинацию обоих этих компонентов. Гетерологичный полипептидный компонент может содержать константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, трансферрин или его фрагмент, последовательность PAS, последовательность НАР, их производные либо варианты или любые комбинации этих компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения неполипептидный связывающий компонент содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксистилювый крахмал (ГЭК), производное или любые комбинации этих компонентов. В определенных вариантах реализации изобретения может быть один, два, три или более гетерологичных компонентов, которые могут являться одинаковыми либо разными молекулами.

1) Константная область иммуноглобулина или ее часть.

Константная область иммуноглобулина состоит из доменов, называемых СН (константными тяжелыми - от англ. "constant heavy") доменами (СН1, СН2 и т.д.). В зависимости от изотипа (т.е. IgG, IgM, IgA IgD или IgE) константная область может состоять из трех или четырех СН доменов. Некоторые изотипы (например, IgG) константных областей также содержат шарнирный участок. См. Janeway et al. 2001, *Immunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

Константную область иммуноглобулина или ее часть для получения химерного белка, являющегося объектом настоящего изобретения, можно получить из большого числа различных источников. В предпочтительных вариантах реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть получена из человеческого иммуноглобулина. При этом понятно, что константная область иммуноглобулина или ее часть может быть получена из иммуноглобулина других видов млекопитающих, включая, к примеру, виды грызунов (например, мышь, крысу, кролика, морскую свинку) или приматов за исключением человека (например, шимпанзе, макаку). Более того, константная область иммуноглобулина или ее часть может быть получена из иммуноглобулина любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и иммуноглобулина любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте реализации изобретения применяется человеческий изотип IgG1.

Большое количество генетических последовательностей константной области иммуноглобулина (например, человеческих генетических последовательностей константной области) доступны в виде открытых баз данных. Можно выбрать последовательность доменов константной области, имеющую определенную эффекторную функцию (или с отсутствием определенной эффекторной функции), или с определенной модификацией для снижения иммуногенности. Было опубликовано большое количество данных последовательностей антител и кодирующих антитела генов, и подходящие последовательности константной области Ig (например, шарнирная, СН2 и/или СН3 последовательности или их части) можно получить из этих последовательностей, используя общепринятые в данной области техники методы. Генетический материал, полученный любым из вышеописанных способов, может затем быть изменен либо синтезирован для того, чтобы получить полипептиды, являющиеся объектами настоящего изобретения. Следует также принять во внимание, что в объем данного изобретения включены аллели, варианты и мутации ДНК последовательностей константной области.

Последовательности константной области иммуноглобулина или ее части можно клонировать, например, при помощи полимеразной цепной реакции и праймеров, которые выбраны таким образом, чтобы амплифицировать представляющий интерес домен. Для того чтобы клонировать константную область иммуноглобулина или ее часть из антитела, можно выделить иРНК из клеток гибридомы, селезенки или лимфоцитов, обратно транскрибировать в ДНК, а гены антитела амплифицировать ПЦР. Методы ПЦР-амплификации детально описаны в патентах US №№ 4683195; 4683202; 4800159; 4965188 и, например, в "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270). ПЦР может инициироваться консенсусными праймерами константной области или более специфичными праймерами на основе опубликованных данных по ДНК- и аминокислотным последовательностям тяжелой и легкой цепи. Как обсуждалось выше, ПЦР также можно применять для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае скрининг библиотек может проводиться по консенсусному праймеру или более крупным гомологичным зондам, таким как зонды мышевой константной области. В данной области техники известны многочисленные группы праймеров, подходящих для амплификации генов антител (например, 5'-концевые праймеры на основе N-концевой последовательности очищенных антител (Benhar and Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); быстрая амплификация концов кДНК (Rumbi, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); лидерные последовательности антител (Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250). Клонирование последовательностей антител дополнительно описано в Newman et al., патент US № 5658570, зарегистрированного 25 января 1995 г., который включен в данный текст посредством ссылки.

Применяемая в данном изобретении константная область иммуноглобулина может содержать все домены и шарнирный участок либо их части. В одном варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит домен СН2, домен СН3 и шарнирный участок, например Fc-область или FcRn партнера по связыванию.

Употребляемый в данном тексте термин "Fc-область" определяется как часть полипептида, которая соответствует Fc-области нативного иммуноглобулина, т.е. так, что образована путем димерной ассоциации соответствующих Fc-доменов своих двух тяжелых цепей. Нативная Fc-область образует гомодимер с другой Fc-областью. В противоположность этому употребляемый в данном тексте термин "генетически слитая Fc-область" или "одноцепочечная Fc-область" (оцFc-область) относится к синтетической димерной Fc-области, состоящей из Fc-доменов, генетически связанных в пределах одной полипептидной цепи (т.е. кодируемых одиночной непрерывной генетической последовательностью).

В одном варианте реализации изобретения термин "Fc-область" относится к части одиночной тяжелой цепи иммуноглобулина, начиная с шарнирного участка выше сайта расщепления папаином (т.е. остатка 216 в IgG, принимая, что первый остаток тяжелой цепи константной области имеет номер 114) и

заканчивая С-концом антитела. Соответственно, полная Fc-область содержит, по меньшей мере, шарнирный участок, домен CH2 и домен CH3.

Fc-область константной области иммуноглобулина в зависимости от изотипа иммуноглобулина может содержать домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирный участок. Химерные белки, содержащие Fc-область иммуноглобулина, приобретают некоторое количество необходимых свойств химерного белка, включая повышенную стабильность, повышенное сывороточное время полужизни (см. Capon et al., 1989, *Nature* 337:525), а также связывание с Fc-рецепторами, такими как неонатальный Fc-рецептор (FcRn) (патенты US №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US 2003-0235536 A1), которые в полном объеме включены в данный текст посредством ссылки.

Константная область иммуноглобулина или ее часть может являться партнером по связыванию FcRn. FcRn активен во взрослых эпителиальных тканях и экспрессируется в полости кишечника, в легочных дыхательных путях, на носовых поверхностях, на вагинальных поверхностях, поверхностях толстой и прямой кишки (патент US № 6485726). Партнер по связыванию FcRn представляет собой часть иммуноглобулина, которая связывается с FcRn.

FcRn-рецептор выделяли из нескольких видов млекопитающих, включая человека. Известны последовательности человеческого FcRn, обезьяньего FcRn, крысиного FcRn и мышьного FcRn (Story et al. 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). FcRn-рецептор связывает IgG (но не связывает другие классы иммуноглобулина, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низком уровне pH, активно транспортирует IgG трансцеллюлярно в направлении от луминального к серозному, а затем высвобождает IgG при относительно более высоком уровне pH, характерном для интерстициальных жидкостей. Он экспрессируется во взрослой эпителиальной ткани (патенты US №№ 6485726, 6030613, 6086875; WO 03/077834; US 2003-0235536 A1), включая легочный и кишечный эпителий (Israel et al. 1997, *Immunology* 92:69), почечный проксимальный тубулярный эпителий (Kobayashi et al. 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), а также эпителий носовой полости, вагинальные поверхности и поверхности желчных протоков.

Партнеры по связыванию FcRn, применяемые в настоящем изобретении, включают молекулы, которые могут специфически связываться с FcRn-рецептором, включая целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые содержат полный связывающий участок FcRn-рецептора. Участок той части Fc-области IgG, которая связывается с FcRn-рецептором, был описан на основе рентгеноструктурной кристаллографии (Burmeister et al. 1994, *Nature* 372:379). Основная контактная область Fc с FcRn находится в районе соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn находятся в пределах одиночной тяжелой цепи Ig. Партнеры по связыванию FcRn включают целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые содержат полный связывающий участок FcRn. Основные контактные участки включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3. Все ссылки, приведенные на нумерацию иммуноглобулинов или фрагментов либо участков иммуноглобулина, основаны на Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

Fc-области или партнеры по связыванию FcRn, связанные с FcRn, могут эффективно переноситься через эпителиальные барьеры посредством FcRn, что, таким образом, обеспечивает неинфекционные средства для систематического введения необходимой терапевтической молекулы. Вдобавок, слитые белки, содержащие Fc-области или партнеров по связыванию FcRn, эндоцитозируются клетками, экспрессирующими FcRn. Но, вместо того, чтобы помечаться для дальнейшей деградации, эти слитые белки снова возвращаются в циркуляцию, что, таким образом, увеличивает *in vivo* время полужизни этих белков. В определенных вариантах реализации изобретения части константных областей иммуноглобулина являются Fc-областью или партнером по связыванию FcRn, которые обычно объединяются при помощи дисульфидных связей и других неспецифических взаимодействий с другой Fc-областью или другим партнером по связыванию FcRn для того, чтобы образовать димер или мультимеры более высоких порядков.

Два FcRn-рецептора могут связывать одиночную Fc-молекулу.

Кристаллографические данные позволяют предположить, что каждая молекула FcRn связывает одиночный полипептид гомодимера Fc. В одном варианте реализации изобретения присоединение партнера по связыванию FcRn, например Fc-фрагмента IgG, к биологически активной молекуле обеспечивает средства доставки биологически активной молекулы перорально, буквально, подъязычно, ректально, вагинально, в виде назального применения аэрозоля или через легочные дыхательные пути, либо через окулярные пути. В другом варианте реализации изобретения химерный белок можно вводить инвазионно, например подкожно, внутривенно.

Участок партнера по связыванию FcRn является такой молекулой или ее частью, которая может специфически связываться FcRn-рецептором с последующим активным транспортом посредством FcRn-рецептора Fc-области. Специфическое связывание обозначает образование двумя молекулами комплекса, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание характеризуется высокой аффинностью и емкостью от низкой до умеренной в отличие от неспецифического связывания, которое обычно обладает низкой аффинностью с емкостью от умеренной до высокой. Как правило, связывание считается специфическим, когда постоянная аффинности КА выше, чем 10^6 M^{-1} ,

или выше, чем 10^8 М⁻¹. В случае необходимости неспецифическое связывание может быть снижено без существенного влияния на специфическое связывание при помощи варьирования условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, время, отведенное на связывание, концентрация блокирующего вещества (например, сывороточно-го альбумина, молочного казеина) и т.д., могут быть оптимизированы специалистом в данной области техники при помощи стандартных методов.

В определенных вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит один или более процессированных Fc-областей, которые, несмотря на это, способны обеспечивать Fc-области связывающие свойства Fc-рецептора (FcR). Например, часть Fc-области, которая связывается с FcRn (т.е. связывающая часть FcRn), содержит аминокислоты, приблизительно соответствующие 282-438 аминокислотам IgG1 по европейской нумерации (с первичными контактными участками, соответствующими аминокислотам 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314, принадлежащим домену CH2, и аминокислотным остаткам 385-387, 428 и 433-436, принадлежащим домену CH3). Таким образом, Fc-область, являющаяся объектом данного изобретения, может содержать или состоять из связывающей части FcRn. Связывающие части FcRn могут быть получены из тяжелых цепей любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте реализации изобретения используется связывающая часть FcRn из антитела человеческого изотипа IgG1. В другом варианте реализации изобретения используется связывающая часть FcRn из антитела человеческого изотипа IgG4.

В другом варианте реализации изобретения "Fc-область" содержит аминокислотную последовательность Fc-домена или полученную из Fc-домена. В определенных вариантах реализации изобретения Fc-область содержит по меньшей мере один элемент из шарнирного (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнирного участка) домена (приблизительно соответствующего аминокислотам 216-230 Fc-области антитела согласно европейской нумерации), домена CH2 (приблизительно соответствующего аминокислотам 231-340 Fc-области антитела согласно европейской нумерации), домена CH3 (приблизительно соответствующего аминокислотам 341-438 Fc-области антитела согласно европейской нумерации), домена CH4 либо их варианта, части или фрагмента. В других вариантах реализации изобретения Fc-область содержит полный Fc-домен (т.е. шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3). В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит, состоит преимущественно из или состоит из шарнирного домена (или его части), сшитого с доменом CH3 (или его частью), шарнирного домена (или его части), сшитого с доменом CH2 (или его частью), домена CH2 (или его части), сшитого с доменом CH3 (или его частью), домена CH2 (или его части), сшитого с шарнирным доменом (или его частью) и доменом CH3 (или его частью). В других вариантах реализации изобретения в Fc-области отсутствует по меньшей мере часть домена CH2 (например, весь домен CH2 или его часть). В конкретном варианте реализации изобретения Fc-область содержит или состоит из аминокислот, соответствующих номерам от 221 до 447 по европейской нумерации.

Fc-области, обозначаемые в данном тексте как F, F1 или F2, могут быть получены из большого количества различных источников. В одном варианте реализации изобретения Fc-область полипептида получена из человеческого иммуноглобулина. При этом понятно, что Fc-область может быть получена из иммуноглобулина других видов млекопитающих, включая, к примеру, виды грызунов (например, мышь, крысу, кролика, морскую свинку) или приматов за исключением человека (например, шимпанзе, макаку). Более того, полипептид Fc-доменов или его части могут быть получены из иммуноглобулина любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и иммуноглобулина любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В другом варианте реализации изобретения используется человеческий изотип IgG1.

В определенных вариантах реализации изобретения Fc-вариант приводит к изменению по меньшей мере в одной эффекторной функции, обеспечиваемой Fc-областью, содержащей указанный Fc-домен дикого типа (например, улучшению или снижению способности Fc-области связываться с Fc-рецепторами (например, Fc γ RI, Fc γ RII или Fc γ RIII) или белками комплемента (например, C1q), либо к триггерной антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), фагоцитозу или комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗКЦ)). В других вариантах реализации изобретения Fc-вариант обеспечивает наличие сконструированного остатка цистеина.

Fc-области, являющиеся объектами данного изобретения, могут включать принятые в данной области техники Fc-варианты, которые, как известно, приводят к изменению (например, усилению или снижению) в эффекторной функции и/или связывании FcR или FcRn. В частности, связывающая молекула, являющаяся объектом данного изобретения, может содержать, например, изменение (например, замену) в одной или более аминокислотных позициях, подобное описанным в международных публикациях согласно PCT WO 88/07089 A1, WO 96/14339 A1, WO 98/05787 A1, WO 98/23289 A1, WO 99/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 00/09560 A2, WO 00/32767 A1, WO 00/42072 A2, WO 02/44215 A2, WO 02/060919 A2, WO 03/074569 A2, WO 04/016750 A2, WO 04/029207 A2, WO 04/035752 A2, WO 04/063351 A2, WO 04/074455 A2, WO 04/099249 A2, WO 05/040217 A2, WO 04/044859, WO 05/070963 A1, WO 05/077981 A2, WO 05/092925 A2, WO 05/123780 A2, WO 06/019447 A1, WO 06/047350 A2 и WO 06/085967 A2; патентных публикациях US №№ US 20070231329, US 20070231329, US 20070237765, US 20070237766, US 20070237767, US 20070243188, US 20070248603, US 20070286859, US 20080057056;

или патентах US 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253; 7083784; 7404956 и 7317091, которые все включены в данный текст посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения может быть внесено конкретное изменение (например, конкретная замена одной или более аминокислот, описанная в данной области техники) в одну или более из описанных аминокислотных позиций. В другом варианте реализации изобретения может быть внесено отличное изменение в одну или более из описанных аминокислотных позиций (например, отличная замена одной или более аминокислот, описанная в данной области техники).

Fc-область или партнер по связыванию FcRn, принадлежащие IgG, могут быть модифицированы в соответствии с общепринятыми процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и тому подобное, для получения модифицированных фрагментов IgG или Fc или их частей, которые будут связывать FcRn. Такие модификации включают модификации, удаленные от контактных участков FcRn, а также модификации, находящиеся в пределах контактных участков FcRn, которые сохраняют или даже усиливают связывание с FcRn. Например, следующие одиночные аминокислотные остатки в Fc человеческого IgG1 (Fc γ 1) можно заменить без значительной потери аффинности связывания Fc к FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где, например, P238A представляет пролин дикого типа, замещенный аланином в позиции номер 238. В качестве примера конкретный вариант реализации изобретения включает мутацию N297A, при помощи которой удаляется высококонсервативный участок N-гликозилирования. В добавок к аланину другие аминокислоты могут замещать аминокислоты дикого типа в позициях, приведенных выше. Мутации могут одиночно вноситься в Fc, что приводит к получению более чем сотни Fc-областей, отличных от нативной Fc. В добавок, комбинации двух, трех или более из этих отдельных мутаций могут вноситься совместно, что приводит к получению сотен дополнительных Fc-областей. Более того, одна или более из Fc-областей конструкции, являющейся объектом данного изобретения, может быть мутированной, в то время как другая Fc-область конструкции не является мутированной, либо они обе могут быть мутированными но содержать различные мутации.

Отдельные из вышеописанных мутаций могут приводить к новым функциональным возможностям Fc-области или партнера по связыванию FcRn. Например, один вариант реализации изобретения включает N297A, при помощи которой удаляется высококонсервативный участок N-гликозилирования. Действие этой мутации состоит в снижении иммуногенности, тем самым повышая время полужизни циркуляции Fc-области, и в приведении Fc-области в состояние, в котором она не способна связываться с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB и Fc γ RIIIA без потери аффинности к FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Дополнительным примером новых функциональных возможностей, обусловленных вышеописанными мутациями, является возможное в некоторых случаях повышение аффинности к FcRn по сравнению с таковой для дикого типа. Эта повышенная аффинность может отражаться на повышенной скорости ассоциации, сниженной скорости диссоциации либо как повышенной скорости ассоциации, так и сниженной скорости диссоциации. Примеры мутаций, которые, как считается, приводят к повышенной аффинности к FcRn, включают, но не ограничиваются этим, T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

В добавок, обнаружилось, что по меньшей мере три человеческих Fc γ рецептора распознают связывающий участок IgG в пределах нижнего шарнирного участка, а именно аминокислоты 234-237. Следовательно, другой пример новых функциональных возможностей и потенциально сниженной иммуногенности может обуславливаться мутациями в этой области, например замещением аминокислот 233-236 человеческого IgG1 "ELLG" соответствующей последовательностью из IgG2 "PVA" (с одной аминокислотной делецией). Было показано, что Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1 в случае внесения таких мутаций. Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 и Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613.

В одном варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть, например Fc-область, представляет собой полипептид, содержащий последовательность PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 3) и в некоторых случаях дополнительно содержащий последовательность, выбранную из HQSLGTQ (SEQ ID NO: 4), HQNLSDGK (SEQ ID NO: 5), HQNISDGK (SEQ ID NO: 6) или VISSH LGQ (SEQ ID NO: 7) (патент US № 5739277).

В другом варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит аминокислотную последовательность в шарнирном участке или его части, который образует одну или более дисульфидных связей с другой константной областью иммуноглобулина или ее частью.

Дисульфидная связь, образованная константной областью иммуноглобулина или ее частью, приводит к размещению вместе первого полипептида, содержащего Ф VIII, и второго полипептида, содержащего фрагмент ФВ, таким образом, что эндогенный ФВ не замещает фрагмент ФВ и не связывается с Ф VIII. Следовательно, дисульфидная связь между первой константной областью иммуноглобулина или ее частью и второй константной областью иммуноглобулина или ее частью предотвращает взаимодействие между эндогенным ФВ и белком Ф VIII. Подавление взаимодействия между ФВ и белком Ф VIII дает возможность выйти за пределы двукратного увеличения времени полужизни белка Ф VIII. Шарнирный участок или его часть может быть дополнительно связан с одним или более доменами из СН1, СН2, СН3, их фрагментами или любыми их комбинациями. В конкретном примере константная область иммуноглобулина или ее часть содержит шарнирный участок и участок СН2 (например, аминокислоты 221-340 Fc-области).

В определенных вариантах реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть является гемигликозилированной. Например, химерный белок, содержащий две Fc-области или двух партнеров по связыванию FcRn, может содержать первую гликозилированную Fc-область (например, гликозилированный участок СН2) или партнера по связыванию FcRn и вторую агликозилированную Fc-область (например, агликозилированный участок СН2) или партнера по связыванию FcRn. В одном варианте реализации изобретения между гликозилированной и агликозилированной областями может быть помещен линкер. В другом варианте реализации изобретения Fc-область или партнер по связыванию FcRn является полностью гликозилированным, т.е. все Fc-области гликозилированы. В других вариантах реализации изобретения Fc-область может быть агликозилированной, т.е. ни один из компонентов Fc не является гликозилированным.

В определенных вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит аминокислотную замену в константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-варианты), которая изменяет антиген-независимые эффекторные функции константной области Ig, в частности время полужизни циркуляции белка.

Такие белки демонстрируют как повышенное, так и сниженное связывание с FcRn по сравнению с белками, у которых отсутствуют подобные замены, и, следовательно, характеризуются, соответственно, увеличенным или сниженным временем полужизни в сыворотке крови. Предполагается, что Fc-варианты с улучшенной аффинностью к FcRn характеризуются более продолжительным временем полужизни в сыворотке крови, и такие молекулы имеют полезные применения в способах лечения млекопитающих, в которых требуется продолжительное время полужизни применяемого полипептида, например, для лечения хронического заболевания или нарушения (см., например, патенты US 7348004, 7404956 и 7862820). В противоположность этому считается, что Fc-варианты со сниженной аффинностью связывания FcRn характеризуются более короткими временами полужизни, и такие молекулы также применимы, например, для введения млекопитающим в случае, когда более короткое время циркуляции может быть более преимущественным, например, для in vivo диагностической визуализации или в ситуациях, когда исходный полипептид имеет токсические побочные эффекты при нахождении в циркуляции на протяжении продолжительных периодов. Также Fc-варианты со сниженной аффинностью связывания FcRn имеют меньшую вероятность прохождения через плаценту и, следовательно, применимы также для лечения заболеваний или нарушений у беременных женщин. Вдобавок, другие применения, в которых может требоваться сниженная аффинность связывания FcRn, включают такие применения, в которых требуется локализация мозга, почки и/или печени. В одном иллюстративном варианте реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, демонстрирует сниженный транспорт из сосудистой системы через эпителий почечных клубочков. В другом варианте реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, демонстрирует сниженный транспорт через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) из мозга в сосудистое пространство. В одном варианте реализации изобретения белок с измененным связыванием FcRn содержит по меньшей мере одну Fc-область или одного партнера по связыванию FcRn (например, одну или две Fc-области или партнеров по связыванию FcRn), содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах "FcRn-связывающей петли" константной области Ig. FcRn-связывающая петля состоит из аминокислотных остатков 280-299 (согласно европейской нумерации) полноразмерной Fc-области дикого типа. В других вариантах реализации изобретения константная область Ig в химерном белке или ее часть, являющаяся объектом данного изобретения и имеющая измененную аффинность связывания FcRn, содержит по меньшей мере одну Fc-область или одного партнера по связыванию FcRn, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах 15 Å-й "контактной зоны" FcRn. Употребляемый в данном тексте термин 15 Å-ая "контактная зона" FcRn включает в себя остатки в следующих позициях полноразмерного Fc-компонентента дикого типа: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (европейская нумерация). В других вариантах реализации изобретения константная область Ig или ее часть, являющаяся объектом данного изобретения и имеющая измененную аффинность связывания FcRn, содержит по меньшей мере одну Fc-область или одного партнера по связыванию FcRn, содержащую одну или более аминокислотных замен в аминокислотной позиции, соответствующей любой из следующих позиций согласно европейской нумерации: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (например, N434A или

N434K) и 438. Примеры аминокислотных замен, которые изменяют активность связывания FcRn, раскрыты в международной публикации согласно РСТ № WO 05/047327, которая включена в данный текст посредством ссылки.

Fc-область или партнер по связыванию FcRn, применяемые в данном изобретении, могут также содержать общепринятую в данной области техники аминокислотную замену, которая изменяет гликозилирование химерного белка. Например, Fc-область или партнер по связыванию FcRn химерного белка, связанные с фрагментом ФВ или белком Ф VIII, могут содержать Fc-область, содержащую мутацию, которая приводит к сниженному гликозилированию (например, N- или O-связанному гликозилированию), либо могут содержать измененную гликоформу Fc-компонента дикого типа (например, гликан с низким содержанием или отсутствием фукозы).

В одном варианте реализации непроцессированный химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, может содержать генетически сплитую Fc-область (т.е. оцFc-область), содержащую одну или более непрерывных константных областей или их частей, независимо выбранных из описанных в данном тексте константных областей или их частей. В одном варианте реализации изобретения Fc-области димерной Fc-области являются одинаковыми. В другом варианте реализации изобретения по меньшей мере две Fc-области являются разными. Например, Fc-области или партнеры по связыванию FcRn, принадлежащие белкам, являющимся объектами данного изобретения, содержат одинаковое количество аминокислотных остатков либо они могут отличаться по длине на один или более аминокислотных остатков (например, на около 5 аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков), около 10 остатков, около 15 остатков, около 20 остатков, около 30 остатков, около 40 остатков или около 50 остатков). В других вариантах реализации Fc-области или партнеры по связыванию FcRn, принадлежащие белку, являющемуся объектом данного изобретения, могут отличаться в последовательности по одной или более аминокислотным позициям. Например, по меньшей мере две Fc-области или два партнера по связыванию FcRn могут отличаться по около 5 аминокислотным позициям (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотным позициям), около 10 позициям, около 15 позициям, около 20 позициям, около 30 позициям, около 40 позициям или около 50 позициям).

2) Альбумин или его фрагмент или вариант.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный компонент, связанный с фрагментом ФВ или связанный с белком Ф VIII, является альбумином или его функциональным фрагментом. В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит белок Ф VIII и альбумин или его фрагмент, при этом альбумин или его фрагмент экранирует или защищает ФВ-связывающий участок белка Ф VIII, тем самым подавляя или предотвращая взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ.

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА или СА) - белок, имеющий полноразмерную форму из 609 аминокислот - отвечает за значительную часть осмотического давления сыворотки, а также действует как носитель эндогенных и экзогенных лигандов. Употребляемый в данном тексте термин "альбумин" включает в себя полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог.

В одном варианте реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и альбумин, его фрагмент или вариант, при этом фрагмент ФВ связан с альбумином или его фрагментом или вариантом. В другом варианте реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ и белок Ф VIII, которые связаны друг с другом, при этом фрагмент ФВ связан с альбумином или его фрагментом или вариантом, белок, имеющий активность VIII, связан с альбумином или его фрагментом или вариантом, либо и фрагмент ФВ и белок, имеющий активность VIII, связаны с альбумином или его фрагментом или вариантом. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ, связанный с альбумином или его фрагментом или вариантом, и дополнительно связанный с гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК и ПЭГ. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ и белок Ф VIII, которые связаны друг с другом, при этом белок Ф VIII связан с альбумином или его фрагментом или вариантом и дополнительно связан с гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК и ПЭГ. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ, связанный с альбумином или его фрагментом или вариантом, и белок Ф VIII, связанный с альбумином или его фрагментом или вариантом, которые связаны друг с другом, при этом фрагмент ФВ дополнительно связан с первым гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК и ПЭГ, а белок Ф VIII дополнительно связан со вторым гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК и ПЭГ.

В других вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, связанным с фрагментом ФВ или белком Ф VIII, является альбумин или его фрагмент или вариант, который продлевает (или

способен продлевать) время полужизни фрагмента ФВ или белка Ф VIII. Дополнительные примеры альбумина или его фрагментов или вариантов раскрыты в патентных публикациях US №№ 20080194481A1, 20080004206 A1, 20080161243 A1, 20080261877 A1 или 20080153751 A1 или заявках на публикацию на патентную публикацию US №№ 2008033413 A2, 2009058322 A1 или 2007021494 A2.

3) Альбуминсвязывающее вещество.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, связанным с фрагментом ФВ или белком Ф VIII, является альбуминсвязывающее вещество, которое содержит альбуминсвязывающий пептид, бактериальный альбуминсвязывающий домен, фрагмент альбуминсвязывающего антитела или любые комбинации этих компонентов. Например, альбуминсвязывающий белок может являться бактериальным альбуминсвязывающим белком, антителом или фрагментом антитела, включая доменные антитела (см. патент US № 6696245). Альбуминсвязывающий белок, к примеру, может являться бактериальным альбуминсвязывающим доменом, таким как домен стрептококкового протеина G (Konig, T. and Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). Другие примеры альбуминсвязывающих пептидов, которые могут применяться в качестве конъюгационных партнеров, включают, например, те, которые содержат консенсусные последовательности Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, где Xaa₁ является Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa₂ является Asn, Gln, H является, Ile, Leu или Lys; Xaa₃ является Ala, Asp, Phe, Trp или Tug; и Xaa₄ является Asp, Gly, Leu, Phe, Ser и Thr, как описано в патентной заявке US 20030069395 или в Dennis et al. (Dennis et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043).

4) Последовательность PAS.

В других вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, связанным с фрагментом ФВ или белком Ф VIII, является последовательность PAS. В одном варианте реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и последовательность PAS, при этом фрагмент ФВ связан с последовательностью PAS. В другом варианте реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит белок Ф VIII и последовательность PAS, при этом последовательность PAS экранирует или защищает ФВ-связывающий участок белка Ф VIII, тем самым подавляя или предотвращая взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ.

При употреблении в данном тексте выражение последовательность PAS обозначает аминокислотную последовательность, содержащую, главным образом, остатки аланина и серина, или содержащую, главным образом, остатки аланина, серина и пролина аминокислотную последовательность, образующую произвольную спиральную конформацию в физиологических условиях. Соответственно, последовательность PAS является строительным блоком, аминокислотным полимером либо кассетой последовательности, содержащей, состоящей преимущественно из или состоящей из аланина, серина и пролина, и которая может быть использована как часть гетерологичного компонента в химерном белке. При этом специалисту в данной области техники известно, что аминокислотный полимер также может образовывать произвольную спиральную конформацию в случае, когда отличные от аланина, серина и пролина остатки добавляют в последовательность PAS в качестве миорных компонентов. Употребляемый в данном тексте термин "миорный компонент" означает, 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%, т.е. около 10 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 9%, т.е. около 9 из 100 аминокислот, до около 8%, т.е. около 8 из 100 аминокислот, около 6%, т.е. около 6 из 100 аминокислот, около 5%, т.е. около 5 из 100 аминокислот, около 4%, т.е. около 4 из 100 аминокислот, около 3%, т.е. около 3 из 100 аминокислот, около 2%, т.е. около 2 из 100 аминокислот, около 1%, т.е. около 1 из 100 из 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, Tug и Val.

В физиологических условиях участок последовательности PAS образует произвольную спиральную конформацию и, тем самым, может опосредовать повышенную *in vivo* и/или *in vitro* устойчивость к фактору ФВ или белку коагулирующей активности. Так как произвольная спиральная конформация сама по себе не образует устойчивой структуры или не функционирует, биологическая активность, опосредованная фрагментом ФВ или белком Ф VIII, с которым она связана, сохраняется в значительной степени. В других вариантах реализации изобретения последовательности PAS, которые образуют произвольную спиральную конформацию, являются биологически инертными, в особенности в отношении протеолиза в плазме крови, иммуногенности, изоэлектрической точки/изоэлектрического поведения, связывания с рецепторами клеточных поверхностей или интернализации, но в то же время являются биоразлагаемыми, что обеспечивает чистое преимущество перед синтетическими полимерами, такими как ПЭГ.

Неограничивающие примеры последовательностей PAS, образующих произвольную спиральную конформацию, включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 8), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 9),

APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 10), APSSPSPSAPSSPSPASP (SEQ ID NO: 11),

SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO: 12), AASPAAPSAPPAAASPAAPSPAPP (SEQ ID NO: 13) и

ASAAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 14) или любых их комбинаций.

Дополнительные примеры последовательностей PAS известны, например, из патентной публикации

US № 20100292130 A1 и заявки на публикацию на патентную публикацию US № WO 2008/155134 A1.

5) Последовательность НАР.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, связанным с фрагментом ФВ или белком Ф VIII, является богатый глицином гомоаминокислотный полимер (НАР - от англ. "homo-amino-acid polymer"). Последовательность НАР может содержать повторяющуюся последовательность глицина, которая составляет по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, 120 аминокислот, 140 аминокислот, 160 аминокислот, 180 аминокислот, 200 аминокислот, 250 аминокислот, 300 аминокислот, 350 аминокислот, 400 аминокислот, 450 аминокислот или 500 аминокислот в длину. В одном варианте реализации изобретения последовательность НАР способна продлевать время полужизни компонента, сшитого или связанного с последовательностью НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают, но не ограничиваются этим, $(\text{Gly})_n$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ или $S(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20. В одном варианте реализации изобретения n равно 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В другом варианте реализации изобретения n равно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200. См., например, Schlapschy M. et al., Protein Eng. Design Selection, 20: 273-284 (2007).

6) Трансферрин или его фрагмент.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, связанным с фрагментом ФВ или белком Ф VIII, является трансферрин или его фрагмент. Для получения химерного белка, являющегося объектом данного изобретения, может быть использован любой трансферрин. Примером может служить человеческий Тф(Тф) дикого типа, который является белком из 679 аминокислот, примерно в 75 КДа (без учета гликозилирования), с двумя основными доменами - N (около 330 аминокислот) и C (около 340 аминокислот), происхождение которого связано с дупликацией гена. См. учетные номера GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 и S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov/), которые в полном объеме включены в данный текст посредством ссылки. Трансферрин содержит два домена - домен N и домен C. Домен N содержит два субдомена - домен N1 и домен N2, а домен C содержит два субдомена - домен C1 и домен C2.

В одном варианте реализации изобретения часть трансферрина химерного белка содержит сплайс-вариант трансферрина. В одном примере сплайс-вариант трансферрина может являться сплайс-вариантом человеческого трансферрина, например это номер Genbank AAA61140. В другом варианте реализации изобретения часть трансферрина химерного белка содержит один или более доменов последовательности трансферрина, например домен N, домен C, домен N1, домен N2, домен C1, домен C2 или любые их комбинации.

7) Полимер, например полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В других вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, присоединенным к фрагменту ФВ или белку, характеризующемуся коагулирующей активностью, например Ф VIII-активностью, является растворимый полимер, известный в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль, кополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстрин или поливиниловый спирт. Гетерологичный компонент, такой как растворимый полимер, может быть присоединен в любой позиции в пределах фрагмента ФВ или белка Ф VIII, либо к N- или C-концу. В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит белок Ф VIII и ПЭГ, при этом ПЭГ экранирует или защищает ФВ-связывающий участок белка Ф VIII, тем самым подавляя или предотвращая взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и ПЭГ, при этом фрагмент ФВ связан с ПЭГ. В другом варианте реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ и белок Ф VIII, которые связаны друг с другом, при этом фрагмент ФВ связан с ПЭГ, белок Ф VIII связан с ПЭГ либо и фрагмент ФВ, и белок Ф VIII связаны с ПЭГ. В других вариантах реализации изобретения химерный белок, содержащий фрагмент ФВ, связанный с ПЭГ, дополнительно связан с гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК, альбумина, его фрагмента или варианта. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ и белок Ф VIII, которые связаны друг с другом, при этом белок Ф VIII дополнительно связан гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК, альбумина, его фрагмента или варианта. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит фрагмент ФВ, связанный с ПЭГ, и белок Ф VIII, связанный с ПЭГ, которые связаны друг с другом, при этом фрагмент ФВ дополнительно связан с первым гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК, альбумина, его фрагмента или варианта, а белок Ф VIII дополнительно связан со вторым гетерологичным компонентом, выбранным из группы, состоящей из константной области иммуноглобулина или ее части (например, Fc-области), последовательности PAS, ГЭК, альбумина, его фрагмента или варианта.

Также в изобретении предложены химически модифицированные производные химерного белка, являющегося объектом данного изобретения, которые могут обеспечивать дополнительные преимущества, такие как повышенные растворимость, стабильность и время циркуляции полипептида либо сниженная иммуногенность (см. патент US № 4179337). Химические компоненты для модификации могут быть выбраны из группы, состоящей из водорастворимых полимеров, включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль, кополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстран или поливиниловый спирт. Химерный белок может быть модифицирован в произвольных позициях в пределах молекулы или в N- или C-концах либо в заданных позициях в пределах молекулы и может содержать один, два, три или более присоединенных химических компонентов.

Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Для полиэтиленгликоля в одном варианте реализации изобретения молекулярная масса составляет величину между около 1 и около 100 кДа для удобства в эксплуатации и производстве. Могут использоваться и другие размеры в зависимости от необходимого профиля (например, необходимой продолжительности пролонгированного высвобождения, воздействий в случае какой-либо биологической активности, удобства в эксплуатации, степени или отсутствия антигенности и других известных воздействий полиэтиленгликоля на белок или его аналог). Например, полиэтиленгликоль может иметь среднюю молекулярную массу, составляющую около 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 или 100000 кДа.

В некоторых вариантах реализации полиэтиленгликоль может иметь разветвленную структуру. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте US № 5643575; Mogurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); и Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999), которые все в полном объеме включены в данный текст посредством ссылки.

Также может варьироваться количество (т.е. степень замещения) полиэтиленгликольных компонентов, присоединенных к каждому химерному белку, фрагменту ФВ или белку Ф VIII, которые являются объектами данного изобретения. Например, пэгилированные белки, которые являются объектами данного изобретения, могут быть связаны в среднем с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 или более молекулами полиэтиленгликоля. Аналогично, средняя степень замещения находится в пределах диапазонов, таких как 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 или 18-20 полиэтиленгликольных компонентов на молекулу белка. Способы определения степени замещения обсуждаются, например, в Delgado et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992).

В некоторых вариантах реализации изобретения белок Ф VIII может быть ПЭГилированным. ПЭГилированный фактор VIII может обозначать коньюгат, образованный между фактором VIII и по меньшей мере одной молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ).

В других вариантах реализации применяемый в изобретении белок Ф VIII коньюгирован с одним или более полимерами. Полимер может быть водорастворимым и ковалентно либо нековалентно присоединенным к фактору VIII или другим компонентам, коньюгированным с фактором VIII. Неограничивающими примерами могут быть поли(оксид алкилена), поли(винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиоксазолин или полис(акрилоилморфолин). Дополнительные типы полимер-коньюгированного Ф VIII раскрыты в патенте US № 7199223.

8) Гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК).

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом, присоединенным к фрагменту ФВ или белку Ф VIII, является полимер, например гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК) или его производное. В одном варианте реализации изобретения химерный белок содержит описанный в данном тексте фрагмент ФВ и ГЭК, при этом фрагмент ФВ связан с ГЭК. В других вариантах реализации химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, содержит белок Ф VIII, сшитый с гидроксиэтиловым крахмалом (ГЭК), при этом гидроксиэтиловый крахмал или его производное экранирует или защищает ФВ-связывающий участок белка Ф VIII от эндогенного ФВ, тем самым подавляя или предотвращая взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ.

Гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК) является производным амилопектина природного происхождения и в организме расщепляется α -амилазой. ГЭК является замещенным производным углеводного полимера амилопектина, который присутствует в кукурузном крахмале в концентрации до 95 мас.%. ГЭК проявляет полезные биологические свойства и применяется клиниками в качестве вещества для замещения объема крови в гемодилюционной терапии (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987); и Weidler et al., Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498 (1991)).

Амилопектин содержит компоненты глюкозы, при этом в основной цепи находятся α -1,4-гликозидные связи, а в разветвляющихся участках находятся α -1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства этой молекулы определяются, главным образом, типом гликозидных связей. Благо-

дarya разорванной α -1,4-гликозидной связи получают спиральные структуры, содержащие около шести мономеров глюкозы на виток. Физико-химические, а также биохимические свойства полимера могут быть модифицированы при помощи замещения. При помощи щелочного гидроксиэтилирования можно осуществлять введение гидроксиэтиловой группы. Подбирая условия реакции можно получить различную реактивность соответствующей гидроксигруппы в незамещенном мономере глюкозы по отношению к гидроксиэтилированию. Благодаря этому факту специалист в данной области техники может в ограниченной степени влиять на схему замещения.

ГЭК, главным образом, характеризуется распределением молекулярной массы и степенью замещения. Степень замещения, обозначаемая как С3, обозначает молярное замещение, известное специалистам в данной области. См. Sommermeyer et al., *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278 (1987), как указано выше, в частности с. 273.

В одном варианте реализации изобретения гидроксиэтиловый крахмал имеет среднюю молекулярную массу (среднюю массу), составляющую от 1 до 300 кД, от 2 до 200 кД, от 3 до 100 кД или от 4 до 70 кД. Гидроксиэтиловый крахмал может дополнительно иметь степень молярного замещения, составляющую от 0,1 до 3, предпочтительно от 0,1 до 2, более предпочтительно от 0,1 до 0,9, предпочтительно от 0,1 до 0,8, и соотношение между С2:С6 заменой в диапазоне от 2 до 20 по отношению к гидроксиэтиловым группам. Неограничивающим примером ГЭК, имеющего среднюю молярную массу около 130 кД, является ГЭК со степенью замещения, составляющей от 0,2 до 0,8, например 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8, предпочтительно от 0,4 до 0,7, например 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7. В конкретном варианте реализации изобретения ГЭК со средней молярной массой около 130 кД является ВОЛЮВЕН® от Fresenius. ВОЛЮВЕН® является искусственным коллоидом, применяемым, например, для замещения объема, которое используется в показаниях к применению для лечения или профилактики гиповолемии. Характеристиками ВОЛЮВЕН® являются средняя молярная масса в 130000 ± 20000 Д, молярное замещение 0,4 и соотношение С2:С6 около 9:1. В других вариантах реализации изобретения диапазоны средней молекулярной массы гидроксиэтилового крахмала составляют, например, от 4 до 70 кД, или от 10 до 70 кД, или от 12 до 70 кД, или от 18 до 70 кД, или от 50 до 70 кД, или от 4 до 50 кД, или от 10 до 50 кД, или от 12 до 50 кД, или от 18 до 50 кД, или от 4 до 18 кД, или от 10 до 18 кД, или от 12 до 18 кД, или от 4 до 12 кД, или от 10 до 12 кД, или от 4 до 10 кД. В других вариантах реализации изобретения средняя молекулярная масса применяемого гидроксиэтилового крахмала находится в диапазоне от более чем 4 и до 70 кД, например около 10 кД, или в диапазоне от 9 до 10 кД, или от 10 до 11 кД, или от 9 до 11 кД, или около 12 кД, или в диапазоне от 11 до 12 кД, или от 12 до 13 кД, или от 11 до 13 кД, или около 18 кД, или в диапазоне от 17 до 18 кД, или от 18 до 19 кД, или от 17 до 19 кД, или около 30 кД, или в диапазоне от 29 до 30 кД, или от 30 до 31 кД, или около 50 кД, или в диапазоне от 49 до 50 кД, или от 50 до 51 кД, или от 49 до 51 кД.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичным компонентом могут быть смеси гидроксиэтиловых крахмалов, имеющих различные средние молекулярные массы и/или различные степени замещения, и/или различные соотношения C2:C6 замещения. Следовательно, могут применяться смеси гидроксиэтиловых крахмалов, имеющие различные средние молекулярные массы и различные степени замещения, и различные соотношения C2:C6 замещения, или имеющие различные средние молекулярные массы и различные степени замещения, и одинаковые либо приблизительно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющие различные средние молекулярные массы и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и различные соотношения C2:C6 замещения, или имеющие различные средние молекулярные массы и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и различные соотношения C2:C6 замещения, или имеющие одинаковые либо приблизительно одинаковые средние молекулярные массы и различные степени замещения, и одинаковые либо приблизительно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющие одинаковые средние молекулярные массы и различные степени замещения, и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и различные соотношения C2:C6 замещения, или имеющие одинаковые средние молекулярные массы и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и одинаковые либо приблизительно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющие одинаковые средние молекулярные массы и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и различные соотношения C2:C6 замещения, или имеющие одинаковые средние молекулярные массы и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и одинаковые либо приблизительно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющие одинаковые средние молекулярные массы и одинаковые либо приблизительно одинаковые степени замещения, и одинаковые либо приблизительно одинаковые соотношения C2:C6 замещения.

9) Полисиаловые кислоты (ПСК).

В определенных вариантах реализации изобретения неполипептидным гетерологичным компонентом, присоединенным к фрагменту ФВ или белку Ф VIII, является полимер, например полисиаловые кислоты (ПСК) или их производные. Полисиаловые кислоты (ПСК) имеют природное происхождение и являются неразветвленными полимерами сиаловой кислоты, которые синтезируются определенными бактериальными штаммами или в определенных клетках млекопитающих Roth J., et al. (1993) in Polysialic Acid: From Microbes to Man, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland), pp. 335-348. Их можно синтезировать с различной степенью полимеризации от $n=$ около 80 или более остатков сиаловой кислоты до $n=2$ при помощи ограниченного кислотного гидролиза или при помощи расщепления нейраминидазами, или при помощи фракционирования природных, полученных из бакте-

рий форм полимера. Состав различных полисиаловых кислот также варьируется таким образом, что существуют гомополимерные формы, т.е. α -2,8-связанная полисиаловая кислота, содержащая капсулный полисахарид штамма K1 *E. coli* и менингококки группы В, которую также можно обнаружить в эмбриональной форме адгезивных молекул нервных клеток (N-CAM - от англ. "neuronal cell adhesion molecule"). Также существуют гетерополимерные формы, такие как чередующаяся α -2,8 и α -2,9 полисиаловая кислота штамма K92 *E. coli* и полисахариды группы C *N. meningitidis*. Сиаловую кислоту также можно обнаружить в чередующихся кополимерах с мономерами, отличающимися от сиаловой кислоты, таких как группа W135 или группа Y *N. meningitidis*. Полисиаловые кислоты обладают важными биологическими функциями, включая уклонение патогенных бактерий от иммунной системы и системы комплемента и регуляцию глиальной адгезионной способности незрелых нейронов во время фетального развития (при этом полимер имеет антиадгезионную функцию) Cho and Troy, P.N.A.S., USA, 91 (1994) 11427-11431, хотя рецепторы полисиаловых кислот у млекопитающих не известны. α -2,8-Связанная полисиаловая кислота штамма K1 *E. coli* также известна как "коломиновая кислота" и используется (с разными длинами) в качестве примера реализации настоящего изобретения. Были описаны различные способы присоединения или конъюгации полисиаловых кислот к полипептиду (например, см. патент US № 5846951; WO-A-0187922 и US 2007/0191597 A1, которые все в полном объеме включены в данный текст посредством ссылки.

С) Белок Ф VIII.

Употребляемое в данном тексте выражение "белок Ф VIII" обозначает функциональный полипептид Ф VIII в своей обычной роли в коагуляции, если не указано иное. Термин белок Ф VIII включает в себя функциональный фрагмент, вариант, аналог или производное, которые сохраняют функцию полноразмерного фактора VIII дикого типа в процессе коагуляции. Выражение "белок Ф VIII" взаимозаменяется употребляется с выражение полипептид (или белок) Ф VIII или просто Ф VIII. Примеры функций Ф VIII включают, но не ограничиваются этим, способность активировать коагуляцию, способность действовать как кофактор фактора IX или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов, которые затем преобразуют фактор X в активированную форму Xa. Белок Ф VIII может являться человеческим, свиным, собачьим, крысиным или мышевым белком Ф VIII. Вдобавок, при сравнении Ф VIII, полученного от людей и других видов, были обнаружены консервативные остатки, которые, вероятно, являются необходимыми для функционирования (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); US 6,251,632).

Существует большое количество тестов для оценки функции системы свертывания крови: тест на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), хромогенный анализ, метод ротационной тромбоэластометрии (РОТЭМ), тест на протромбиновый индекс (ПИ) (также применяемый для определения МНО), фибриноген-тест (часто проводимый методом Клауса), количество тромбоцитов, тестирование тромбоцитарной функции (часто проводимое при помощи РFA-100), тромбиновое время, время кровотечения, тест смещивания (показывающий, исправляется ли нарушение при смещивании плазмы крови пациента с нормальной плазмой), анализ фактора свертывания крови, антифосфолипидные антитела, D-димер, генетические тесты (например, фактор V Лайдена, мутация протромбина G20210A), время разбавленного яда гадюки Рассела (dRVVT-тест), различные тесты тромбоцитарной функции, тромбоэластография (ТЭГ или Соноклот), тромбоэластометрия (ТЭМ®, например РОТЭМ®) или время лизиса эуглобулина (ВЛЭ).

АЧТВ-тест является показателем эффективности и определяет эффективность как "внутреннего" (также называемого механизмом активации свертывания крови), так и общего механизма коагуляции. Этот тест обычно применяется для определения коагулирующей активности коммерчески доступных рекомбинантных факторов свертывания крови, например Ф VIII или Ф IX. Он применяется совместно с тестом на протромбиновый индекс (ПИ), который определяет внешний механизм.

РОТЭМ-анализ дает информацию о полной кинетике гемостаза: времени свертывания крови, образования тромбов, стабильности тромбов и лизисе. Разные параметры в тромбоэластометрии зависят от активности плазматической коагулирующей системы, тромбоцитарной функции, фибринолиза или многих факторов, которые влияют на эти взаимодействия. Данный метод может дать полную информацию о вторичном гемостазе.

Известны полипептидные и полинуклеотидные последовательности Ф VIII, как и последовательности большого количества функциональных фрагментов, мутантов и модифицированных версий. Примеры последовательностей (полноразмерных) человеческого Ф VIII приведены как подпоследовательности в SEQ ID NO: 16 или 18.

Таблица 2

Полноразмерный Φ VIII (сигнальный пептид Φ VIII выделен подчеркиванием; тяжелая цепь Φ VIII выделена двойным подчеркиванием; В-домен выделен курсивом; и легкая цепь Φ VIII показана обычным текстом)

Сигнальный пептид: (SEQIDNO: 15)
MQIELSTCFFLCLLRCFS

Зрелый факторVIII (SEQIDNO: 16)*

ATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPVNDARPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVFTDHLFNIAKPRPPWMGL
LGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSOREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK
ENGPMASDPLCLTYSYLSHVVDLKVDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDLEGKSWHSETK
NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPVHSISFLEGHTFLVRNHRQA
SLEISPITFLTAQTLMDLGQFLLFCISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPOLRMKNNEAEDYDDDLTDSEM
DVVRFDDNSPSFIOIRSVAKKHPTWVHYIAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLNNGPQRIGRKYKKV
RFMAYTDETFKTRAEI0HESGILGPLYGEVGDTLITIFKNAQASRFYNTIYPHGIDTVRPLYSRRLPKGVKH
LKDFFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMRDLSASLGLIGPLLICYKESVDQRGNOIIMS
DKRNVTILFSVFDENRWSYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYI
LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTTLTFPSGETVFMSENPGWLILGCHNSDFRNRCMTALLKVSS
CDKNTGDDYEDSYEDISAYLLSKNNATEPRFSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPK
IQNVSSSDLMRLRQSPFPHGLSLSLDQEAQYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSQDMVFTPE
SGLQLRNEKLGTTAATELKQLDFKVSSSTSNNLISTIPSDNLAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQDFTTLFG
KKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKVNSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVS
ISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLTIENSPSVWQNILESDEFKVTPLIHDRLMDKNATALRNHMS
NKTTSSKMEMVQOKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMFPLPESARWQRTHGKNSLNSQGQPSPKQIVSLGPEK
SVEGQNFLSEKNVVGKGEFTKDVGKLEMVFPPSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLQE
NVVLQPQIHTVTGKTNFMKNLFLSTRQNVEGSDAYAPVLQDFRSILNDSTNRTKHTAHFSKKGEENLE
GLGNQTKQIVEKYACTRISPTNSQNFVTQRSKRALQFRLPIEETELEKRIIVDDTSTQWSKNNMKHLTP
STLTQIDYNEKEGAIITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLQDNSSHLPAAS
YRKKDSGVLTQESSHFLQGAKKNNLSLAITLEMTGDRREVGSILGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGK
VELLPKVHIIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLILOGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLL
DPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKDDTILSLNACESNHAIAAINEQNKPEIEVTWAKQGRTE
RLCSQNPPVLKRHOREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVE
RLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLLGPGYIRAEVEDNIMVTF
RNQASRPYSFYSSLISYEEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCAKAWAYFSDVDEKD
VHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHRQVTQEFALFFTIFDETWSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYR
FHAINGYIMDTLPGILVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM
LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLLRHSGSI
NAWSTKEPFSWIKV DLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV
DSSGIKHNIFNPPPIARYIRLHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFA
TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVGTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWT
LFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLIRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Таблица 3

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный Ф VIII (SEQ ID NO: 17)*

ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTG
721 CTTCTTCTGCCCCCTTGCATTCTGCTTAGTGCACAGAACAGATACTACCTGGGTG
781 AGTGGAACTGTATGGGACTATATGCACAAAGTGTACCTGGTGAGCTGCCTGAGCAG
841 ATTTCTCTAGAGTGCACAAATCTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGACAAAAGAC
901 TCTGTTTGTAGAAATTCCGGATCACCTTCAACATCGTAAGGCCAGGGCACCTGGAT
961 GGGTCTGCTAGGTCTTACCATCCAGGGTGAGGTTATGATACAGTGGTATTACACTTAA
1021 GAAACATGGCTTCCCCATCCTGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC
1081 TGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCACTGAAAGGGAGAAAAGAAGATGATAAGTCTT
1141 CCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTCAGGTCAGGTCTGAAAGAGAAATGGTCAATGGCCTC
1201 TGACCCACTGTGCTTACCTACTCATATCTTCTATGTCAGGACCTGGTAAAGACTTGAA
1261 TTCAAGGCTCATTGGAGCCACTAGTAGTATGTTAGAGAAAGGGAGCTGGCAAGGAAAGAC
1321 ACAGACCTTGCACAAATTATACTACTCTTGTCTATTGATGAAGGAAAAGTGGCA
1381 CTCAGAACAAAGAACCTCTGTAGCAGGATAGGGATGGCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC
1441 TAAAATGCAACAGCTAACAGTTATGTAACAGCTCTGCCAGGTCAGTCAGTCAGTC
1501 CAGGAATACGTCATTGGCATGTTAGGAACTGGCAGGACTCTGTAAGTCAGTC
1561 ATTCTCGAAGGTACACATTCTGTGAGGAACCATCGCCAGGCTCTGGAAATCTC
1621 GCCAATAACTTCTTACTGCTAACACACTCTGATGGACCTGGACAGTTCTACTGTT
1681 TTGTCATATCTTCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAACCCCAACTCGAATGAAAATAATGAGAAGCGAAGACTATGATGATGA
1801 TCTTACTGATTCTGAAATGGATGTTGTCAGGTTGATGATGACAACTCTCTTCTCTTAT
1861 CCAAATTGCTCAGTGGCCAAGAACGATCCTAAACACTGGGTACATTACATTGCTGTA
1921 AGAGGGAGACTGGGACTATGTCCTCTAGTCCTGGCCCCGATGACAGAAAGTTAAAAG
1981 TCAATATTGAAACAATGCCCTCAGGGATTGGTAGAAGTACAAAAAGTCGATTAT
2041 GGCATACACAGATGAAACCTTAAAGACTCGTGAACCTATTCAAGGAACTTCTT
2101 GGGACCTTACTTTATGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATTTAAGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCATATAACATCTACCCACGGAAACTGATGTCCTGCTTGTATTCAAG
2221 GAGATTACCAAAAGGTGAAACATTGAGGATTTCACCTGCCCCAGGAAATATT
2281 CAAATATAATGGACAGTACTGTAAGAGATGGCCAACTAAATCAGATCCTGGTGCCT
2341 GACCGCCTATTACTCTGTTCTGTTATGGAGAGAGATCTGCTTCTCAGGACTCATGG
2401 CCCCCTCCTCATCTGCTACAAAGAACACTGTAAGTCAAGAGGAAACCGATAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAATGTCATCCTGTTCTGTATTGATGGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGA
2521 GAATATACAACGCTTCTCCCAATCAGCTGGAGTGCAGCTGGATTCAGAGTTCCA
2581 AGCCTCAAACATCATGCACAGCATCAATGGTATGTTTGATAGTTGCAGTTGTCAGT
2641 TTGTTGATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAACGATTGGAGCAGACAGTACTGTTCT
2701 TTCTGTCCTCTCTGATATACCTCAAAACACAAATGGTCTATGAAAGACACACTCAC
2761 CCTATTCCCATCTCAGGAGAAACTGTCTCATGTCAGGGAAACCCAGCTATGGAT
2821 TCTGGGTGCCAAACTCAGACTTCTGGAGAGGCGATGCCCTTACTGAGGTTTC
2881 TAGTTGATGCAAGAACACTGGTATTACAGGAGACAGTTGAAGATATTGAGCATA
2941 CTTGCTGAGTAAAACATGCCATTGAAACCAAGAACGACTTCTCCAGAAATCACAGACACCC
3001 TAGCACTAGGCAAAGCAATTAAATGCCACCCAAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAC
3061 TGACCTTGGTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAACATACAAATGTCCTCTAGTGA
3121 TTTGTTGATGCTCTGGCACAGACTCTACTCCACATGGCTATCCTTATGATCTCCA
3181 AGAAAGCAAATATGAGACTTTCTGATGATGATCCATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCGAAATGACACACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGACATGGTATT
3301 TACCCCTGAGTCAGGCCCTCAATTAAAGATTAATGAGAAAATGGGACACTGCGACAA
3361 AGAGTTGAAGAACACTGTTCAAAAGTCTAGTACATCAAAATATCTGATTCAACAT
3421 TCCATCAGACAATTGGCAGCAGGTACTGATAATACAGTTCCTTAGGACCCCAAGTAT
3481 GCCAGTTCAATTGATGATGCAATTAGATACCACTCTATTGGCAAAAGTCATCTCCCT
3541 TACTGAGTCGGTGGACCTCTGAGCTGAGTGAAGAAAATATGATTCAAAGTTGTTAGA
3601 ATCAGGTTAATGAATAGCAAGAAAGTCACTGGGAAAAATGTATGTCACAGAGAG
3661 TGGTAGGTTATTTAAAGGAAAAGAGCTCATGGACCTGCTTGTGACTAAAGATAATGC
3721 CTTATTCAAAGTGTAGCATCTTTGTTAAAGACAAACAAAATCTCAATAATCAGCAAC
3781 TAATAGAAAAGCTCACATTGATGGCCCATCATTATAATGAGAAATGTCATCAGTC
3841 GCAAAATATATTAGAAAAGTGCACACTGAGTTAAAAAGTGCACCTTGTATTGACAG
3901 ATACGCTTATGGACAAATGTCACAGCTTGGAGGTCATATGTCACAAATTAACACTAC
3961 TTGATGTCACAAACATGGAAATGGTCAACAGAAAAAGAGGGCCCAATTCCACAGATGC

4021 ACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTAAAGATGCTATTCTGCCAGAATCAGCAAGGTGGAT
 4081 ACAAAGGACTCATGAAAGAACCTCTGAACTCTGGCAAGGCCAGTCCAAGCAATT
 4141 AGTATCCTTAGGACAGAAAAATCTGGAAGGTAGAATTCTTGTCTGAGAAAAACAA
 4201 AGTGGTAGTAGGAAAGGGTAATTACAAAGGACTAGGACTCAAAGAGATGGTTTCC
 4261 AAGCAGCAGAAACCTATTCTTAACACTTGGATAATTACATGAAAATAACACACAA
 4321 TCAAGAAAAAAATTCAAGGAAGAAATAGAAAAGAAGGAAACATTAATCCAAGAGAATGT
 4381 AGTTTGCTCAGATAACATACAGTGAUTGGCACTAAGAATTTCATGAAGAACCTTTCTT
 4441 ACTGAGCACTAGGCAAATGTAGAAGGTTCATATGACGGGGCATATGCTCAGTACTTCA
 4501 AGATTTAGGTCAATTAAATGATTCAACAAATAGAACAAAGAACACACAGCTCATTCTC
 4561 AAAAAAAGGGGAGGAAGAAAACCTGGAAAGGCTTGGGAATCAAACCAAGCAAAATTGAGA
 4621 GAAATATGCATGCACCAAGGATATCTCTAATACAAGGCCAGCAGAATTGTCACGCC
 4681 ACGTAGTAGAGAGAGCTTGAACAAATTCAAGACTCCACTAGAAGAAAACAGACTTGAAAA
 4741 AAGGATAATTGTGGATGACACCTCAACAGACTGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCC
 4801 GAGCACCCCTCACACAGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCC
 4861 CTTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGATCTCCATTACC
 4921 CATTGCAAAGGTATCATCTTCCATCTATTAGACCTATATATCTGACCAGGGCTTCTATT
 4981 CCAAGACAACCTCTTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAAGAAGATTCTGGGGTCCA
 5041 AGAACAGCTGATTTCTTACAAGGAGCCAAAAAAAATAACCTTCTTCTAGGCATTCTAAC
 5101 CTTGGAGATGACTGGTCAAGAGGGTGGCTCCCTGGGACAAGTGCCACAAATT
 5161 AGTCACATACAAGAAAGTTGAGAACACTGTCTCCGGAAACACAGACTTGCCAAAACATC
 5221 TGGCAAAGGTGAATTGCTCCAAAGGTTCAATTTCAGAAGGACCTTCCCTACGG
 5281 AACTAGCAATGGGTCTCTGGCATCTGGATCTCGTGGAAAGGGAGCCTCTCAGGGAAAC
 5341 AGAGGGAGCGATTAAGTGGATGAAGCAAACAGACACTGGAAAAGTTCCCTTCTGAGAGT
 5401 AGCAACAGAAAGCTGCAAAGACTCCCTCAAGCTATTGGATCCTCTGGCTGGGATAA
 5461 CCACTATGGTAACAGATAACCAAAAGAAGATGGAAATCCAAGAGAAGTCACCAAGAAAA
 5521 AACAGCTTTAAAGAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAATCATGC
 5581 AAATAGCAGCAATAATGGGGAGCAAAATAAGCCGAAATAGAAGTCACCTGGGCAAAGCA
 5641 AGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTAAACACCACAGCTTGAACAGCCATCAACGGGA
 5701 ATAACTCGTACTACTCTTCAGTCAGATAAGAGGAAATTGACTATGATGATAACCATATC
 5761 AGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTGACATTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCG
 5821 CAGCTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTA
 5881 TGGGATGAGTAGCTCCACATGTTCTAAGAACACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCA
 5941 GTTCAAGAAAGTTGTTTCCAGGAATTACTGATGGCTCTTACTCAGCCCTTATACCG
 6001 TGGAGAACTAAATGAACATTGGGACTCTCTGGGCAATATAAGAGCAGAAGTTGAAGA
 6061 TAATATCATGGTAACCTTCAGAAATCAGGCCTCTGTCCTTCTATTCTAGCCT
 6121 TATTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCACACTAGAAAATTTGTCAAGCC
 6181 TAATGAAACCAAAACTTACTTTGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGA
 6241 GTTTGAUTGCAAAAGCCTGGGCTTATTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTC
 6301 AGGCCTGATTGGACCCCTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCTGCTCATGGGAG
 6361 ACAAGTGACAGTACAGAAATTGCTCTGTTTCACCATCTTGATGAGACCAAAGCTG
 6421 GTACTTCACTGAAATAATGGAAGAACACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGA
 6481 TCCCACCTTAAAGAGAATTATGCTCTCATGCAATGGCTACATAATGGATACACT
 6541 ACCTGGCTTAGTAAATGGCTCAGGATCAAAGGATTGATGTTACTGCTCAGCATGGGAG
 6601 CAATGAAAACATCCATTCTATTCAATTGCTGAGCATGTTACTGAGGAGCAGGGATTT
 6661 GGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATTGAGGAGCAGTGGAAATGTT
 6721 ACCATCCAAAGCTGGAATTGGGGGTGGAATGCCTATTGGCGAGCATCTACATGCTGG
 6781 GATGAGCACACTTTCTGGTGTACAGACAATAGTGTCAAGACTCCCTGGGAATGGCTTC
 6841 TGGACACATTAGAGATTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGCCAAA
 6901 GCTGGCCGACACTTCTTCCGGATCAATCAATGCCTGGGACCAAGGAGCCCTTTC
 6961 TTGGATCAAGGTGGATCTGGTGGCAACATGATTATCAGGGCATCAAGACCCAGGGTGC
 7021 CCGTGCAAGATTCTCCAGCCTACATCTCTGATGTTTATCATGATGATAGTCTTGATGG
 7081 GAAGAAGTGGCAGACTTACGAGGAATTCACTGGAACCTTAATGTTCTTGGCAA
 7141 TGTGGATTCATCTGGGATAAAACACAATTTCACCCCTCAATTATGCTCGATACAT
 7201 CCGTTTGCACCCAACCTCATTATAGCATTGCGCAGCACTCTCGCATGGAGTTGATGGCTG
 7261 TGATTTAAATAGTTGCGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAGCAATATCAGATGCACA
 7321 GATTACTGCTTCACTCTACTTACCAATATGTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAGCTCG
 7381 ACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGT
 7441 GCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGAACATGAAAGTACAGGAGTAACACTCAGGGAGTAAA
 7501 ATCTCTGCTTACCGCATGTTGAGGGACTTCTCATCTCCAGCAGTCAGATGGCCA
 7561 TCAGTGGACTCTTCTTCTGAGATGGCAAGTAAGGTTTCAGGGAAATCAAGACTC
 7621 CTTCACACCTGTGGTGAACCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGTACCTCGAATTCA
 7681 CCCCCAGAGTTGGGTGCACCAAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGCTCGAGGCACA
 7741 GGACCTCTAC

*Выделенные подчеркиванием нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

Полипептиды Ф VIII включают полноразмерный Ф VIII, полноразмерный Ф VIII минус Met на N-конце, зрелый Ф VIII (минус сигнальная последовательность), зрелый Ф VIII с добавочным Met на N-конце и/или Ф VIII с полной или частичной делецией В-домена. В определенных вариантах реализации изобретения варианты Ф VIII включают делеции В-домена как частичные, так и полные.

Ген человеческого Ф 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 8704187; WO 8808035; WO 8803558 и патент US № 4757006). Аминокислотная последовательность Ф VIII была получена с кДНК, как показано в патенте US № 4965199. Ф VIII с частично или полностью удаленным В-доменом

дополнительно приведен в патентах US №№ 4994371 и 4868112. В некоторых вариантах реализации изобретения В-домен человеческого Ф VIII замещен В-доменом человеческого фактора V, как показано в патенте US № 5004803. Последовательность кДНК, кодирующая человеческий фактор VIII, и аминокислотная последовательность приведены в SEQ ID NOs: 17 и 16, соответственно, из заявки на патентную публикацию US № 20050100990.

Данные о последовательности свиного Ф VIII были опубликованы в Toole, J.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986). В Healey, J.F., et al., Blood 88:4209-4214 (1996) дополнительно сообщалось о полной свиной последовательности кДНК, полученной при помощи ПЦР амплификации последовательностей Ф VIII из библиотеки кДНК из свиной селезенки. В патенте US № 5364771 авторства Lollar и Runge и в WO 93/20093 описаны гибридный человеческий/свиной Ф VIII, содержащий замены всех доменов, всех субъединиц, и специфические аминокислотные последовательности. Недавно в WO 94/11503 были опубликованы нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная последовательности доменов A1 и A2 свиного Ф VIII и химерного Ф VIII, в котором свиные домены A1 и/или A2 замещают соответствующие человеческие домены. В патенте US № 5859204, Lollar, J.S., также описаны последовательность свиной кДНК и полученные аминокислотные последовательности. В патенте US № 6458563 описан Ф VIII с удаленным В-доменом.

В патенте US № 5859204 авторства Lollar, J.S. сообщается о функциональных мутантах Ф VIII, обладающих сниженной антигенностью и сниженной иммунореактивностью. В патенте US № 6376463 авторства Lollar, J.S. также сообщается о мутантах Ф VIII, обладающих сниженной иммунореактивностью. В заявке на патентную публикацию US № 2005/0100990 авторства Saenko et al. сообщается о функциональных мутациях в домене A2 Ф VIII.

В одном варианте реализации изобретения Ф VIII (или часть Ф VIII в химерном белке) может быть по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности Ф VIII из аминокислот от 1 до 1438 из SEQ ID NO: 18 или аминокислот от 1 до 2332 из SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 (без сигнальной последовательности), или аминокислотной последовательности Ф VIII из аминокислот от 19 до 1438 из SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 или аминокислот от 19 до 2332 из SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 (с сигнальной последовательностью), при этом Ф VIII обладает коагулирующей активностью, например, активирует как кофактор фактор IX для того, чтобы преобразовать фактор X в активированный фактор X. Ф VIII (или часть Ф VIII в химерном белке) может быть идентичным аминокислотной последовательности Ф VIII из аминокислот от 1 до 1438 из SEQ ID NO: 18 или аминокислот от 1 до 2332 из SEQ ID NO: 16 (без сигнальной последовательности). Ф VIII может дополнительно содержать сигнальную последовательность.

Употребляемое в данном тексте выражение "В-домен" Ф VIII означает то же самое, что и известный в данной области техники В-домен, который определяется внутренней идентичностью аминокислотной последовательности и сайтами протеолитического расщепления, например, это остатки Ser741-Arg1648 полноразмерного человеческого Ф VIII. Другие домены человеческого Ф VIII определяются следующими аминокислотными остатками: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; A3, остатки Ser1690-Asn2019; C1, остатки Lys2020-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 включает остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшуюся последовательность, включающую остатки Glu1649-Arg1689, обычно называют а3 кислотным участком. Расположение границ для всех доменов, включая В-домены, для свиного, мышного и собачьего Ф VIII также известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения В-домен Ф VIII удален ("фактор VIII с удаленным В-доменом" или "УВД"). Примером Ф VIII с удаленным В-доменом является РЕФАКТО® (рекомбинантный Ф VIII с удаленным В-доменом), который имеет ту же последовательность, что и часть последовательности фактора VIII в табл. 4 (тяжелая цепь Ф VIII с удаленным В-доменом выделена двойным подчеркиванием; В-домен выделен курсивом; и легкая цепь Ф VIII с удаленным В-доменом показана обычным текстом).

Таблица 4

Φ VIII с удаленным В-доменом (SEQ ID NO: 18)

```

ATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPNDARFPPRVEKSFPNTSVVYKKTLFVFTDHLFNIAKPRPPWMGL
LGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLLHAVGVSYWKASEGAEYDDOTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK
ENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNGLIGALLVCREGSLAKEKTOLHKFILLFAVDEGKSWHSETK
NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYNRSLPGLIGCHRKSVYWHV1GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQA
SLEISPITFLTAQTLMLDLGQFLFCISSHQHDGMEAYVKVDCSPEEPQLRMKNNEAEDYDDDLTDSEM
DVVRFDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKV
RFMAYTDETFKTREAQHESGILGFLILYGEVGTLLIIIFKNQASRPYNIYPHGTIDVRPLYSRRLPKGVKH
LKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQGRNQIMS
DKRNVILFSVFDENRSLWYLTENIQLFLPNPAGVOEDPEFQASNMHSINGYVFDLSLOLSVCLHEVAYWI
LSIGAQTDLFSVFFFSGYTFKHKMVYEDTTLTLPFSGETVFMSENGLWILGCHNSDFRN RGM TALLKVSS
CDKNIGDYYEDSYEDISAYLLSKNNATEPRSFQNPPVLKRHOREITRTTLLSQDQEEDYDDETDISVEMKKE
DFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVFQEFTDGSFTQP
LYRGELNEHLGLLGPIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEEDQRQGAEPKRNFVKPNETKTYFW
KVQHHAAPTKDEFDCAKWAYFSVDLKEKDVKHSGLIGLPGVCHNTLNPAHGRQVTVQEFALETTIFDETKS
WYFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFAINGYIMDTLPGLVMQAQDQRIRWYLLSMGSNEIHSIHF
GHVFTVRKKEEYKMLNLYPGVFTEMPLPSKAGIWRVECLIGEHLAGMSTFLVYSNKCQTPLGMASG
HIRDFQITASGQYQGWAPKALARLHYSGSINAWSTKEPSWIKVDLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQF
IIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIARYIRLHPHTHSIRSTLRLMGCDLN
SCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGV
TTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLTRYLRIHPQSWV
HQIALRMEVLGCEAQDLY

```

Таблица 5

Нуклеотидная последовательность, кодирующая Φ VIII с удаленным В-доменом (SEQ ID NO: 19)*

661	ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTCTTTC
721	TGTGCCTTTGCGATTCTGCTTGTGCCACCAAGAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAC
781	TGTGACTGGACTATATGCAAAGTCTCGTGAGCTGCCCTGTGGACGCAAGATTCTC
841	CTAGAGTGCACAAATCTTTCAACATCGTAAGCCAAGGCACCCCTGGATGGGCTGC
901	TAGAATTCA CGGATCACCTTCAACATCGTAAGCCAAGGCACCCCTGGATGGGCTGC
961	TAGGTCTACC ATCCAGGCTGAGGTTATGATA CAGTGGTATTACACTTAAGAACATGG
1021	CTTCCCACATCTGTCA GTCTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTCTGGAG
1081	CTGAATATGATGATCAGACCA GTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAGTCTCCCTGGT
1141	GAAGCCATACATATGTCAGGCTCTGAAAGAAGATGGTCAATGGCCTCTGACCCAC
1201	TGTGCCTTACACTCATATCTTTCATGTGGACCTGGTAAAGACTTGAATT CAGGCC
1261	TCATTGGAGCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAGACAGACACT
1321	TGCAAAATTATACTACTTTGCTGTATTTGATGAAGGGAAAAGTGGCACTCAGAAA
1381	CAAAGAACCTCTTGATGCGAGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCTAAATGC
1441	ACACAGTCAATGGTTATGTAACAGGGCTCTGCGCAGGTCTGTTGGATGCCACAGGAAT
1501	CAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGCACCACCTCTGAAGTGCACTCAATATTCTCG
1561	AAGGTACACATTCTGTGAGGAACCATGCCAGCGCTTGGAAATCTGCCAATAA
1621	CTTTCCTTACTGCTAACACTCTTGATGGACCTGGACAGTTCTACTGTTTGTCTA
1681	TCTCTTCCCACCAACATGATGGCATGGAAAGCTTATGTCAGACTGCTGAGG
1741	AAACCCAACTACGAATGAAAATATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATCTTACTG
1801	ATTCTGAATGGATGGTCAGGTTGATGATGACA ACTCTCTTCTTATCCAAATTC
1861	GCTCAGTTGCCAAGACATCCTAAACATTGGTACATTACATTGCTGTAAGAGGAGG
1921	ACTGGGACTATGCTCCCTAGTCCTGCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCATATT
1981	TGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCCGATTATGGCATA
2041	CAGATGAAACCTTAAAGACTCGTGAAGCTATTCACTGAATCAGGAATCTGGACCTT
2101	TACITTTATGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATTTAAGAATCAACCAAGCAGAC
2161	CATATAACATCTACCCCACTGAAGGAAACTGCTGCTCTTGTATTCAAGGAGATTAC
2221	CAAAAGGTGAAAACATTGAAGGATTTCCTGAGGAGAAATATTCAAATATA
2281	AATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGCCA ACTAAATCAGATCCTCGGTGACCCGCT
2341	ATTACTCTAGTTCGTTAATATGGAGAGATCTAGCTCAGGACTCATTGGCCCTCTCC

2401 TCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCGAGATAATGTCAGACAAGAGGA
 2461 ATGTCATCTGTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATAC
 2521 AACGCTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCA
 2581 ACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTGATGAGTTGCAGTTGTCAGTTGTTGC
 2641 ATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGAGCACAGACTGACTTCCTTCTGTCT
 2701 TCTTCTGGATATACCTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCC
 2761 CATTCTCAGGAGAAACTGCTTCATGTCGATGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGT
 2821 GCCACAACTCAGACTTCGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTCTAGTTGTG
 2881 ACAAGAACACTGGTATTACAGAGGACAGTTGAGATATTCAAGCATACTGCTGA
 2941 GTAAAAAACATGCCATTGAGAACAGCTCTCAAAACCCACAGCTTGAAACGCC
 3001 ATCAACGGGAAAATCCTACTCTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATG
 3061 ATACCATATCAGTTGAATGAAGAAGGAGATTGACATTATGATGAGGATGAAAATC
 3121 AGAGCCCCCGCAGCTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTATTGCTGCAGTGGAGAGG
 3181 TCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCACATGTTCTAAGAACACAGGGCTAGAGTGGCA
 3241 GTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTCCAGGAATTACTGATGGCTCCTTACTCAGC
 3301 CCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTGGACTCCTGGGCCATATATAAGAGCAG
 3361 AAGTTGAAGATAATCATGGTAACCTTCAGAACATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCTTCT
 3421 ATTCTAGCCTTATTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACT
 3481 TTGAGCAAGCTTAATGAAACCAAAACTACTTTGAGTGCACATCATATGGCACCA
 3541 CTAAGAGTGGTACTTCAACTGAAAATATGAAAGAAACTGCAGGGCTCCCTGAATATCC
 3601 AGATGGAAGATCCCACTTAAAGAGAATTATGCTTCCATGCAATCAATGGTACATAA
 3661 TGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCA
 3721 GCATGGGAGACAAGTGCAGTACAGGAATTGCTCTGTTTACCATCTTGTGAGA
 3781 CCAAAAGCTGGTACTTCAACTGAAAATATGAAAGAAACTGCAGGGCTCCCTGAATATCC
 3841 AGATGGAAGATCCCACTTAAAGAGAATTATGCTTCCATGCAATCAATGGTACATAA
 3901 TGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCA
 3961 GAAAAAAAGAGGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCAGGTGTTTGAGACAG
 4021 TGGAAATGTTACCATCAGGCTGAATTGGGGCTTGAATGCTTATTGCGAGCATC
 4081 TACATGCTGGGATGAGCACACTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTAGACTCCCTGG
 4141 GAATGGCTCTGGACACATTAGAGATTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGT
 4201 GGGCCCCAAAGCTGGCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGG
 4261 AGCCCTTTCTGGATCAAGGTGGATCTGGTGGACCAATGATTATTCAAGGCATCAAGA
 4321 CCCAGGGTGGCGTCAGAGGTTCTCAGCCTACATCTCTCAGTTTATCATCATGTATA
 4381 GTCTTGATGGGAAGAACATGGCAGACTTCTGGAGAACATTCCACTGGAACCTTAATGGTCT
 4441 TCTTTGGCAATGTGGATTCTGGGATAAAACAAATTTTAACCCCTCCAATTATTG
 4501 CTCGATACATCCGTTGCAACCTCATTATAGCATTCGAGCAGTCTTCGCGATGGAGT
 4561 TGATGGGCTGTGATTAAATAGTTGCAAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAGCAATAT
 4621 CAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTGCCACCTGGTCTCCTT
 4681 CAAAAGCTCGACTTCACCTCAAGGGAGGAGTAATGCCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATC
 4741 CAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCAGAACATGAAAGTCACAGGAGTAACACTC
 4801 AGGGAGTAAATCTGCTTACCAAGCATGTATGTAAGGAGTCCCTCATCTCAGCAGTC
 4861 AAGATGGCAGTCACTGTTACCAATGTTGCAAGTGGCAAAGTAAAGGTTTCAAGGGAA
 4921 ATCAAGACTCCTTCACCTGTGGTGAACTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTAC
 4981 TTGCAATTACCCCCAGAGTTGGGTGCAACAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCT
 5041 GCGAGGCACAGGACCTCTAC

*Выделенные подчеркиванием нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

"Ф VIII с удаленным В-доменом" может содержать полные либо частичные делеции, описанные в патентах US №№ 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563. В некоторых вариантах реализации последовательность Ф VIII с удаленным В-доменом, являющаяся объектом настоящего изобретения, содержит любую из делеций, приведенных в патенте US № 6316226 (также в патенте US 6346513) от кол. 4, строка 4 до кол. 5, строка 28, и в примерах 1-5. В другом варианте реализации изобретения фактор VIII с удаленным В-доменом является фактором VIII с удаленным В-доменом S743/Q1638 (SQ УВД Ф VIII) (например, фактором VIII, содержащим делецию от аминокислоты 744 до аминокислоты 1637, например фактором VIII, содержащим аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 из SEQ ID NO: 16, т.е. SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах реализации Ф VIII с удаленным В-доменом, являющейся объектом настоящего изобретения, содержит делецию, приведенную в кол. 2, строки 26-51 и примерах 5-8 патента US № 5789203 (а также в патентах US 6060447, 5595886 и 6228620). В некоторых вариантах реализации изобретения Ф VIII с удаленным В-доменом содержит делецию, приведенную в патенте US № 5972885, от кол. 1, строка 25 до кол. 2, строка 40; в патенте US № 6048720, кол. 6, строки 1-22 и пример 1; в патенте US № 5543502, кол. 2, строки 17-46; в патенте US № 5171844, от кол. 4, строка 22 до кол. 5, строка 36; в патенте US № 5112950, кол. 2, строки 55-68, фиг. 2 и пример 1; в патенте US № 4868112, от кол. 2, строка 2 до кол. 19, строка 21 и табл. 2; в патенте US № 7041635, от кол. 2, строка 1 до кол. 3, строка 19, от кол. 3, строка 40 до кол. 4, строка 67, от кол. 7, строка 43 до кол. 8, строка 26, и от кол. 11, строка 5 до кол. 13, строка 39; или в патенте US № 6458563, кол. 4, строки 25-53.

В некоторых вариантах реализации изобретения Ф VIII с удаленным В-доменом содержит делецию большей части В-домена, но при этом сохраняет аминотерминальные последовательности В-домена, которые выжны для *in vivo* протеолитического процессинга продукта первичной трансляции в двуполипептидную цепь, как описано в WO 91/09122. В некоторых вариантах реализации изобретения конструкция

Ф VIII с удаленным В-доменом содержит делецию аминокислот 747-1638, т.е. фактически полную делецию В-домена. Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Фактор VIII с удаленным В-доменом также может содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 Ф VIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988). Дополнительные делеции В-домена, которые являются частью данного изобретения, включают: делецию аминокислот от 982 до 1562 или от 760 до 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986) 83, 5939-5942), от 797 до 1562 (Eaton, et al. Biochemistry (1986) 25:8343-8347), от 741 до 1646 (Kaufman Kaufman (заявка на публикацию согласно РСТ № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6:553-564), от 741 до 1648 (Pasek (заявка на публикацию согласно РСТ № 88/00831)) или от 816 до 1598 либо от 741 до 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) № 82:16-25, ЕР 295597)). В других вариантах реализации изобретения Ф VIII с удаленным В-доменом содержит полипептид Ф VIII, содержащий фрагменты В-домена, в которых сохранены один или более N-связанных участков гликозилирования, например остатки 757, 784, 828, 900, 963 или, в некоторых случаях, 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности Ф VIII. Примеры фрагментов В-домена включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена, как описано в Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A., et al., J. Thromb. Haemost. 6: 1352-1359 (2008), и Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011) (т.е. сохранены первые 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена). В некоторых вариантах реализации изобретения Ф VIII, содержащий частичный В-домен, является Ф VIII198 (SEQ ID NO: 105). Ф VIII198 является одноцепочечной молекулой-226N6 Ф VIIIIFc, содержащей частичный В-домен. 226 обозначает 226 N-концевых аминокислот В-домена Ф VIII, а N6 обозначает шесть участков N-гликозилирования в В-домене. В других вариантах реализации изобретения Ф VIII с удаленным В-доменом дополнительно содержит точечную мутацию в остатке 309 (от Phe до Ser) для того, чтобы улучшить экспрессию белка Ф VIII с удаленным В-доменом. См. Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004). В других вариантах реализации изобретения Ф VIII с удаленным В-доменом содержит полипептид Ф VIII, содержащий часть В-домена, но не содержащий один или более сайтов расщепления фурином (например, Arg1313 и Arg 1648). См. Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011). Каждую из вышеописанных делеций можно внести в любую последовательность Ф VIII.

Белок Ф VIII, применяемый в настоящем изобретении, может включать Ф VIII, содержащий одну или более гетерологичных последовательностей или их химических или физических модификаций, которые не оказывают влияния на коагулирующую активность Ф VIII. Подобные гетерологичные последовательности или их химические или физические модификации могут быть спаренными с С-концом или N-концом белка Ф VIII либо вставленными между одним или более из двух аминокислотных остатков в белке Ф VIII. Такие вставки в белок Ф VIII не оказывают влияния на коагулирующую активность Ф VIII или функционирование Ф VIII. В одном варианте реализации изобретения данные вставки улучшают фармакокинетические свойства белка Ф VIII (например, время полужизни). В другом варианте реализации изобретения вставки могут быть сделаны на более чем двух, трех, четырех, пяти или шести участках.

В одном варианте реализации изобретения белок Ф VIII расщепляется сразу за аргинином при аминокислоте 1648 (в полноразмерном факторе VIII или SEQ ID NO: 16), аминокислоте 754 (в факторе VIII с удаленным В-доменом S743/Q1638 или SEQ ID NO: 16), или соответствующим аргинину остатком (в других вариантах), тем самым приводя к наличию тяжелой цепи и легкой цепи. В другом варианте реализации изобретения Ф VIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые связаны или соединены посредством ион-опосредованной нековалентной связи.

В других вариантах реализации изобретения Ф VIII является одноцепочечным Ф VIII, который не был расщеплен сразу за аргинином при аминокислоте 1648 (в полноразмерном факторе VIII или SEQ ID NO: 16), аминокислоте 754 (в факторе VIII с удаленным В-доменом S743/Q1638 или SEQ ID NO: 18), или соответствующим аргинину остатком (в других вариантах). Одноцепочечный Ф VIII может содержать одну или более аминокислотных замен. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная замена проведена в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645 или им обоим полипептида полноразмерного зрелого фактора VIII (SEQ ID NO: 16), либо остатку 754, остатку 751 или им обоим фактора VIII с удаленным В-доменом (SEQ ID NO: 18). Аминокислотная замена может представлять собой любые аминокислоты, кроме 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.

Ф VIII может дополнительно расщепляться тромбином, а затем активироваться как Ф VIIIa, выполнения функцию кофактора для активированного фактора IX (Ф IXa). Активированный Ф IX совместно с активированным Ф VIII образует комплекс X-азу и преобразует фактор X в активированный фактор X (Ф Xa). Для активации Ф VIII расщепляется тромбином за тремя остатками аргинина в аминокислотах 372, 740 и 1689 (соответствующих аминокислотам 372, 740 и 795 в последовательности Ф VIII с удаленным В-доменом), при этом расщепление приводит к образованию Ф VIIIa, содержащего цепи A1 в 50 кДа, A2 в 43 кДа и A3-C1-C2 в 73 кДа. В одном варианте реализации белок Ф VIII, применяемый в настоящем изобретении, является неактивированным Ф VIII. В другом варианте реализации изобретения белок Ф VIII является активированным Ф VIII.

Белок, содержащий полипептид Ф VIII, связанный или соединенный с фрагментом ФВ, может содержать последовательность по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 16 или 18, при этом последовательность обладает коагулирующей активностью Ф VIII, например активирует фактор IX как кофактор для преобразования фактора X в активированный фактор X (Ф Xa).

Употребляемое в данном тексте выражение "гибридные" полипептиды и белки означает комбинацию первой полипептидной цепи, например фрагмента ФВ, в некоторых случаях связанной с первым гетерологичным компонентом, со второй полипептидной цепью, например белком Ф VIII, в некоторых случаях связанной со вторым гетерологичным компонентом, образующую, таким образом, гетеродимер. В одном варианте реализации изобретения первый полипептид и второй полипептид в гибридзе связаны друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как заряд-зарядное или гидрофобное взаимодействия. В другом варианте реализации изобретения первый полипептид и второй полипептид в гибридзе связаны друг с другом посредством дисульфидной или другой ковалентной связи(ей). Гибриды описаны, к примеру, в патенте US 2004/101740 и патенте US 2006/074199. Второй полипептид может являться идентичной копией первого полипептида или быть неидентичным полипептидом. В одном варианте реализации изобретения первый полипептид является слитым белком из фрагмента ФВ и Fc, а второй полипептид является полипептидом, содержащим, состоящим преимущественно из или состоящим из FcRn-связывающего домена, при этом первый полипептид и второй полипептид связаны друг с другом. В другом варианте реализации изобретения первый полипептид содержит слитый белок из фрагмента ФВ и Fc, а второй полипептид содержит слитый белок из Ф VIII и Fc, что превращает гибрид в гетеродимер. Первый полипептид и второй полипептид могут быть связаны посредством ковалентной связи, например дисульфидной связи между первой Fc-областью и второй Fc-областью. Первый полипептид и второй полипептид могут быть дополнительно связаны друг с другом посредством связывания между фрагментом ФВ и белком Ф VIII.

Г) Линкеры.

Химерный белок, являющийся объектом настоящего изобретения, дополнительно содержит линкер. Между двумя белками может находиться один или более линкеров, например между дополнительным компонентом и белком Ф VIII (иногда также называемый "Ф VIII/ДК линкер"), между фрагментом ФВ и первым гетерологичным компонентом (иногда также называемый "ФВ линкер"), например, первая Fc-область, между белком Ф VIII и вторым гетерологичным компонентом (иногда также называемый "Ф VIII линкер"), например, вторая Fc-область, между фрагментом ФВ и белком Ф VIII (например, Ф VIII/ДК линкер), между фрагментом ФВ и вторым гетерологичным компонентом и/или между белком Ф VIII и первым гетерологичным компонентом. Все линкеры могут иметь одинаковую или разную последовательность. В одном варианте реализации изобретения линкер является полипептидным линкером. В другом варианте реализации изобретения линкер является неполипептидным линкером.

Линкер, применяемый в настоящем изобретении, может содержать любую органическую молекулу. В одном варианте реализации изобретения линкер является полимером, например полиэтиленгликолем (ПЭГ) или гидроксистиловым крахмалом (ГЭК). В другом варианте реализации изобретения линкер представляет собой аминокислотную последовательность (например, полипептидный линкер). Полипептидный линкер может содержать по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000 аминокислот.

Примеры полипептидных линкеров хорошо известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения линкер содержит последовательность G_n . Линкер может содержать последовательность $(GA)_n$. Линкер может содержать последовательность $(GGS)_n </s1$. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 20). В других вариантах реализации изобретения линкер содержит последовательность $(GGS)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 21). В этих случаях n может быть целым числом в диапазоне 1-100. В других случаях n может быть целым числом в диапазоне 1-20, т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Примеры линкеров включают, но не ограничиваются этим, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 22), GGSGGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 23), GGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 24), GGSGGGSGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 25), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26), линкеры в табл. 13 (SEQ ID NOs: 92, 93 и 94) и линкеры в табл. 14A (SEQ ID NOs: 95, 96 и 97). Линкер не блокирует и не снижает активность фрагмента ФВ или коагулирующую активность фактора VIII. В некоторых случаях линкер усиливает активность фрагмента ФВ или коагулирующую активность белка фактора VIII, например, дополнительно снижая эффекты стерического несоответствия и обеспечивая фрагменту ФВ или части фактора VIII больший доступ к их целевому связывающему участку.

В одном варианте реализации изобретения длина линкера, применяемого в химерном белке, составляет 15-25 аминокислот. В другом варианте реализации изобретения длина линкера, применяемого в хи-

мерном белке, составляет 15-20 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения длина линкера, применяемого в химерном белке, составляет 10-25 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения длина линкера, применяемого в химерном белке, составляет 15 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения линкер, применяемый в химерном белке, представляет собой (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 27), где G является глицином, S является серином, а n является целым числом в диапазоне 1-20.

Д) Сайты расщепления.

Линкер также может содержать компонент, который может отщепляться химически (например, гидролиз или эфирная связь), ферментативно (т.е. включение последовательности расщепления протеазой) или фотолитически (например, хромофор, такой как 3-амино-(2-нитрофенил)пропионовая кислота (АНП)), с целью отделить одну молекулу от другой.

В одном варианте реализации изобретения линкер является отщепляемым линкером. Отщепляемые линкеры могут содержать один или более сайтов расщепления на N-конце или C-конце либо на обоих. В другом варианте реализации изобретения отщепляемый линкер состоит преимущественно из или состоит из одного или более отщепляемых участков. В других вариантах реализации изобретения отщепляемый линкер содержит описанные в данном тексте гетерологичные аминокислотные линкерные последовательности или полимеры и один или более отщепляемых участков.

В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый линкер содержит один или более сайтов расщепления, которые могут расщепляться в клетке-хозяине (т.е. сайты внутриклеточного процессинга). Неограничивающие примеры сайтов расщепления включают RRRR (SEQ ID NO: 52), RKRRKR (SEQ ID NO: 53) и RRRRS (SEQ ID NO: 54).

В других вариантах реализации изобретения отщепляемый линкер содержит один или более сайтов расщепления, которые расщепляются протеазой после введения пациенту химерного белка, содержащего отщепляемый линкер. В одном варианте реализации изобретения сайт расщепления расщепляется протеазой, выбранной из группы, состоящей из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы-2, ММП-12, ММП-13, ММП-17 и ММП-20. В другом варианте реализации изобретения сайт расщепления выбран из группы, состоящей из сайта расщепления Ф XIa (например, KLTR ↓ AET (SEQ ID NO: 29)), сайта расщепления Ф XIa (например, DFTR ↓ VVG (SEQ ID NO: 30)), сайта расщепления Ф XIIa (например, TMTR ↓ IVGG (SEQ ID NO: 31)), сайта расщепления калликреином (например, SPFR ↓ STGG (SEQ ID NO: 32)), сайта расщепления Ф VIIa (например, LQVR ↓ IVGG (SEQ ID NO: 33)), сайта расщепления Ф IXa (например, PLGR ↓ IVGG (SEQ ID NO: 34)), сайта расщепления Ф Xa (например, IEGR ↓ TVGG (SEQ ID NO: 35)), сайта расщепления Ф IIa (тромбином) (например, LTPR ↓ SLLV (SEQ ID NO: 36)), сайта расщепления эластазой-2 (например, LGPV ↓ SGVP (SEQ ID NO: 37)), сайта расщепления гранзимом B (например, VAGD ↓ SLEE (SEQ ID NO: 38)), сайта расщепления MMP-12 (например, GPAG ↓ LGGA (SEQ ID NO: 39)), сайта расщепления MMP-13 (например, GPAG ↓ LRGA (SEQ ID NO: 40)), сайта расщепления MMP-17 (например, APLG ↓ LRLR (SEQ ID NO: 41)), сайта расщепления MMP-20 (например, PALP ↓ LVAQ (SEQ ID NO: 42)), сайта расщепления ВГТ (например, ENLYFQ ↓ G (SEQ ID NO: 43)), сайта расщепления энтерокиназой (например, DDDK ↓ IVGG (SEQ ID NO: 44)), сайта расщепления протеазой 3C (PRESCISSIION™) (например, LEVLFQ ↓ GP (SEQ ID NO: 45)) и сайта расщепления сортазой A (например, LPKT ↓ GSES) (SEQ ID NO: 46). В определенных вариантах реализации изобретения сайты расщепления Ф XIa включают, но не ограничиваются этим, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 47) и SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 48).

Неограничивающие примеры сайта расщепления тромбином включают, например, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 49), TTKIKPR (SEQ ID NO: 50) или LVPRG (SEQ ID NO: 55) и последовательность, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую из ALRPR (например, ALRPRVVGGA (SEQ ID NO: 51)). В конкретном варианте реализации изобретения сайтом расщепления является

TLDPRSFLLRNPNKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 56).

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и способы их получения.

Также в изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий описанный в данном тексте фрагмент ФВ, химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и гетерологичный компонент, химерный белок, содержащий белок Ф VIII и дополнительный компонент, или химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII. В случае, когда фрагмент ФВ в химерном белке связан с гетерологичным компонентом или белком Ф VIII в виде одиночной полипептидной цепи, данное изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему фрагмент ФВ, связанный с гетерологичным компонентом или белком Ф VIII. В случае, когда химерный белок содержит первую и вторую полипептидные цепи, с первой полипептидной цепью, содержащей фрагмент ФВ и первый гетерологичный компонент (например, первую Fc-область), и второй полипептидной цепью, содержащей фрагмент ФВ и второй гетерологичный компонент (например, вторую Fc-область), причем первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь соединены друг с другом, полинуклеотид может содержать первую нуклеотидную последовательность и вторую нуклеотидную последовательность. В одном варианте реализации изобретения первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность принадлежат одному и тому же

полинуклеотиду. В другом варианте реализации изобретения первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность принадлежат двум разным полинуклеотидам (например, разным векторам). В определенных вариантах реализации настоящее изобретение относится к группе полинуклеотидов, содержащей первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует фрагмент ФВ химерного белка, а вторая нуклеотидная цепь кодирует белок Ф VIII.

В других вариантах реализации изобретения группа полинуклеотидов дополнительно содержит добавочную нуклеотидную цепь (например, вторую нуклеотидную цепь, если химерный белок кодируется одиночной полинуклеотидной цепью, или третью нуклеотидную цепь, если химерный белок кодируется двумя полинуклеотидными цепями), которая кодирует протеин-конвертазу. Протеин-конвертаза может быть выбрана из группы, состоящей из пропротеин-конвертазы субтилизин/кексин типа 5 (PCSK5 или PC5), пропротеин-конвертазы субтилизин/кексин типа 7 (PCSK7 или PC7), дрожжевой протеазы Кех 2, пропротеин-конвертазы субтилизин/кексин типа 3 (PACE или PCSK3) и двух или более комбинаций этих компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения протеин-конвертаза представляет собой PACE, PC5 или PC7. В конкретном варианте реализации изобретения протеин-конвертаза представляет собой PC5 или PC7. См. международную заявку № PCT/US 2011/043568, которая включена в данный текст посредством ссылки. В другом варианте реализации изобретения протеин-конвертаза представляет собой PACE/фурин.

В определенных вариантах реализации данное изобретение относится к группе полинуклеотидов, содержащей первую нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3 ФВ, вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Ф VIII, и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую домен D1 и домен D2 ФВ. В этом варианте реализации изобретения домен D1 и домен D2 экспрессируются отдельно (и не связаны с доменом D'D3 фрагмента ФВ) с целью образования подходящей дисульфидной связи и филдинга доменов D'D3. Экспрессия домена D1D2 может происходить как в цис-, так и в транс-форме.

Употребляемое в данном тексте выражение "экспрессионный вектор" относится к любой нуклеотидной конструкции, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае вирусного РНК вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции при внесении в соответствующую клетку-хозяин. Экспрессионные векторы могут включать плазиды, фадиды, вирусы и их производные.

Экспрессионные векторы, являющиеся объектами данного изобретения, будут содержать полинуклеотиды, кодирующие фрагмент ФВ или химерный белок, содержащий фрагмент ФВ.

В одном варианте реализации изобретения последовательность, кодирующая фрагмент ФВ, второй гетерологичный компонент (например, вторую Fc-область) или белок Ф VIII, функционально связанный с управляющей экспрессионной последовательностью. В данном контексте две нуклеотидные последовательности являются функционально связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы обеспечить сохранение функциональности каждого компонента нуклеотидной последовательности. Считается, что кодирующая последовательность и управляющая генной экспрессией последовательность функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности оказалась под влиянием или управлением последовательности, управляющей генной экспрессией. Считается, что две последовательности ДНК функционально связаны, если индукция промотора в 5' последовательности генной экспрессии приводит к транскрипции кодирующей последовательности и если природа связи между двумя последовательностями ДНК не (1) приводит к внесению мутации со сдвигом рамки, (2) препятствует возможности промоторной области управлять транскрипцией кодирующей последовательности или (3) препятствует возможности соответствующего РНК-транскрипта быть транслированным в белок. Таким образом, последовательность генной экспрессии будет функционально связана с кодирующей нуклеотидной последовательностью, если последовательность генной экспрессии способна осуществить транскрипцию данной кодирующей нуклеотидной последовательности так, что полученный транскрипт транслируется в необходимый белок или полипептид.

В данном контексте управляющая генной экспрессией последовательность представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность или промоторно-энхансерная комбинация, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Управляющая генной экспрессией последовательность может, к примеру, являться промотором млекопитающего или вируса, таким как конститутивный или индуцибельный промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, промоторы для следующих генов: гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГРТ), аденоzinдеаминазы, пируваткиназы, промотор β -актина и другие конститутивные промоторы. Примеры вирусных промоторов, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, включают, например, промоторы из цитомегаловируса (ЦМВ), вируса обезьяны (например, SV40), вируса папилломы, аденоvируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Райса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (ДКП) вируса лейкоза Мо-

лони и другие ретровирусы, а также тимидинкиназный промотор вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы известны специалистам в данной области техники. Промоторы, применимые в качестве последовательностей генной экспрессии согласно изобретению, также включают индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы экспрессируются в присутствии индуктора. Например, индукция промотора металлотионеина для стимуляции транскрипции или трансляции происходит в присутствии определенных ионов металлов. Другие индуцибельные промоторы известны специалистам в данной области техники.

В общем случае управляющая генной экспрессией последовательность будет включать, при необходимости, 5' нетранскрибуемые и 5' нетранслируемые последовательности, участвующие в инициации, соответственно, транскрипции и трансляции, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность ЦААТ и им подобные. В частности, такие 5' нетранскрибуемые последовательности будут включать промоторную область, которая содержит промоторную последовательность для управления транскрипцией функционально присоединенной кодирующей нукleinовой кислоты. Последовательности генной экспрессии в некоторых случаях содержат энхансерные последовательности или вышеперечисленные активаторные последовательности, если они необходимы.

Вирусные векторы включают, но не ограничиваются этим, нуклеотидные последовательности следующих вирусов: ретровируса, такого как вирус лейкоза мышей Молони, вирус саркомы мышей Харви, вирус опухоли молочной железы мышей и вирус саркомы Рауса; аденоассоциированного вируса; вирусов типа SV40; полиомавирусов; вирусов Эпштейна-Барра; вирусов папилломы; вируса герпеса; вируса осповакцины; полиовируса; и РНК-вируса, такого как ретровирус. Также можно применять другие хорошо известные в данной области техники векторы. Определенные вирусные векторы происходят от нецитопатических эукариотических вирусов, в которых несущественные гены были заменены генами, представляющими интерес. Нецитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующим проникновением внедрением в клеточную ДНК хозяина. Ретровирусы были апробированы в экспериментах по генной терапии человека. Наиболее подходящие такие ретровирусы, которые являются дефектными по репликации (т.е. способными к прямому синтезу необходимых белков, но неспособными к созданию инфекционных частиц). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы в общем случае используются для высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы по получению дефектных по репликации ретровирусов (включая этапы внесения экзогенного генетического материала в плазмиды, трансфекции пакующей клеточной линии плазмидами, получения рекомбинантных ретровирусов при помощи пакующей клеточной линии, забора вирусных частиц из тканевой культуральной среды и инфекции целевых клеток вирусными частицами) приведены в Kriegler, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman Co., New York (1990) и Murty, E.J., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

В одном варианте реализации изобретения вирус является аденоассоциированным вирусом, двухцепочечным ДНК-вирусом. Аденоассоциированный вирус может быть сконструирован так, чтобы быть дефектным по репликации, и способным инфицировать большое количество типов и видов клеток. Дополнительно он обладает такими преимуществами, как устойчивость к температуре и липидным растворителям; высокие частоты трансдукции в клетках из различных клеточных линий, включая гемопоэтические клетки; и отсутствие ингибирования суперинфекции, что дает возможность осуществления множественных серий трансдукции. Согласно имеющимся сведениям аденоассоциированный вирус может интегрироваться в человеческую клеточную ДНК сайт-специфическим образом, тем самым минимизируя возможность инсерционного мутагенеза и вариабельность экспрессионных характеристик ретровирусной инфекции вставленного гена. Вдобавок, аденоассоциированные вирусные инфекции дикого типа претерпели в тканевой культуре более чем 100 переносов в отсутствие селективного давления, что указывает на то, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса является относительно стабильным явлением. Аденоассоциированный вирус также может функционировать внехромосомным способом.

Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы были подробно описаны в данной области техники и хорошо известны специалистам. 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 являются исключительно удобными для доставки генов в клетки *in vivo* благодаря своей неспособности реплицироваться внутри клетки и интегрироваться в геном организма-хозяина. При этом плазмиды имеют промотор, совместимый с клеткой-хозяином, и могут экспрессировать пептид из гена, функционально кодируемого в пределах плазмиды. Некоторые широкоприменимые плазмиды, предлагаемые частными поставщиками, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные плазмиды pcDNA, pRC/CMV, различные плазмиды pCMV, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры отдельных плазмид включают pcDNA3.1, номер в каталоге V79020; pcDNA3.1/гигро, номер в каталоге V87020; pcDNA4/мус-His, номер в каталоге V86320; и pBudCE4.1, номер в каталоге V53220, предлагаемые всеми компаниями Инваген (Карлсбад, Калифорния). Другие плазмиды известны специалистам в данной области техники. В добавок, плазмиды могут быть разработаны индивидуально при помощи стандартных методов молекулярной биологии для удаления

и/или добавления отдельных фрагментов ДНК.

В одной экспрессионной системе насекомого происхождения, которую можно применять для получения белков, являющихся объектами данного изобретения, для экспрессии чужеродных генов в качестве вектора используется вирус ядерного полигидроза *Autographa californica* (AcNPV). Вирус выращивается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность может быть клонирована в несущественные области (например, ген в форме многогранника) вируса и помещена под управление промотора AcNPV (например, промотора в форме многогранника). Успешная вставка кодирующей последовательности приведет к инактивации гена в форме многогранника и получению невкрапленного рекомбинантного вируса (т.е. вируса с отсутствием белкового покрытия, кодируемого геном в форме многогранника). Эти рекомбинантные вирусы впоследствии применяются для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется вставленный ген (см., например, Smith et al. (1983) J. Virol. 46:584; патент US № 4215051). Дополнительные примеры подобной экспрессионной системы можно найти в Ausubel et al., eds. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Другой системой, которую можно применять для получения белков, являющихся объектами данного изобретения, является система генной экспрессии глутамин синтетазы, также называемая "экспрессионной системой ГС" (Lonza Biologics PLC, Berkshire UK). Эта экспрессионная система детально описана в патенте US № 5981216.

В клетках-хозяевах, принадлежащих млекопитающим, может применяться большое количество экспрессионных систем на вирусной основе. В случаях, когда в качестве экспрессионного вектора применяется аденоовирус, кодирующая последовательность может быть лигирована к аденоовирусному комплексу, управляющему транскрипцией/трансляцией, например позднему промотору и трехкомпонентной лидерной последовательности. Затем этот химерный ген может быть вставлен в геном аденоовируса путем *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка несущественной области вирусного генома (например, области E1 или E3) приведет к образованию рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способным экспрессировать пептид в инфицированном организме-хозяине. См., например, Logan & Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655. В качестве альтернативного варианта может применяться промотор 7.5 K осповакцины. См., например, Mackett et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett et al. (1984) J. Virol. 49:857; Panicali et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:4927.

Для повышения эффективности производства полинуклеотиды могут быть сконструированы таким образом, чтобы кодировать множественные звенья белка, являющегося объектом данного изобретения, разделенные сайтами расщепления ферментами. Результирующий полипептид может быть расщеплен (например, путем обработки соответствующим ферментом) с целью восстановления звеньев полипептида. Это может увеличить выход полипептидов, управляемых одиночным промотором. При применении в соответствующих вирусных экспрессионных системах управление трансляцией каждого полипептида, кодируемого иРНК, происходит внутри транскрипта, например осуществляется участком внутренней посадки рибосомы или УВПР. Таким образом, полицистронная конструкция управляет транскрипцией одиночной, крупной полицистронной иРНК, которая, в свою очередь, управляет трансляцией множественных отдельных полипептидов. В этом подходе не используется получение и ферментативный процессинг полипротеинов, что может значительно повысить выход полипептидов, управляемых одиночным промотором.

Применяемые для трансформации векторы обычно будут содержать селектируемый маркер, который используется для идентификации трансформантов. В бактериальных системах они могут включать гены устойчивости к антибиотикам, таким как ампициллин и канамицин. Селектируемые маркеры для применения в культивируемых клетках млекопитающих включают гены, которые придают устойчивость к лекарственным препаратам, таким как неомицин, гигромицин и метотрексат. Селектируемый маркер может быть амплифицируемым селектируемым маркером. Одним из амплифицируемых селектируемых маркеров является ген дегидрофолатредуктазы (ДГФР). Simonsen C.C. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-9. Обзор по селектируемым маркерам сделан Thilly (1986) *Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., а выбор селектируемых маркеров не составит трудности для специалистов в данной области техники.

Селектируемые маркеры могут быть внесены в клетку при помощи отдельной плазмиды одновременно с представляющим интерес геном, либо они могут быть внесены при помощи той же самой плазмиды. В случае применения одной плазмиды селектируемый маркер и представляющий интерес ген могут находиться под управлением разных промоторов или одного и того же промотора, при этом последняя конфигурация приводит к получению двухцистронной иРНК. Конструкции такого типа известны в данной области техники (например, патент US № 4713339).

Экспрессионные векторы могут кодировать метки, которые дают возможность легкого выведения рекомбинантно произведенного белка. Примеры включают, но не ограничиваются этим, вектор pUR278 (Ruther et al. (1983) EMBO J. 2:1791), в котором кодирующие последовательности для экспрессируемого белка могут быть лигированы в вектор в рамку с кодирующей областью lac Z таким образом, что это приводит к получению меченого слитого белка; векторы pGEX можно применять для экспрессии белков, являющихся объектами данного изобретения, с глутатион-S-трансферазной (GST) меткой. Обычно эти

белки растворимы и легко могут быть выведены из клеток путем адсорбции на глутатион-арагозных гранулах с последующей элюсией в присутствии свободного глутатиона. Векторы содержат сайты расщепления (тромбином или протеазой фактора Xa или PRESCISSION PROTEASE™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) для легкого удаления метки после выведения.

Затем экспрессионные векторы трансфицируются или котрансфицируются в подходящую клетку-мишень, которая будет экспрессировать полипептиды. Известные в данной области техники трансфекционные методы включают, но не ограничиваются этим, осаждение фосфата кальция (Wigler et al. (1978) Cell 14:725), электропорацию (Neumann et al. (1982) EMBO J. 1:841) и реагенты на основе липосом. Для экспрессии описанных в данном тексте белков можно применять большое количество систем хозяин-экспрессионный вектор, включая как прокариотические, так и эукариотические клетки. Такие системы включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*), трансформированные при помощи рекомбинантной ДНК бактериофага или экспрессионных векторов плазмидной ДНК, содержащих соответствующую кодирующую последовательность; дрожжевые или мицелиальные грибы, трансформированные при помощи рекомбинантных дрожжевых или грибных экспрессионных векторов, содержащих соответствующую кодирующую последовательность; клеточные системы насекомого происхождения, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловируса), содержащими соответствующую кодирующую последовательность; клеточные системы растительного происхождения, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вириуса мозаики цветной капусты или вириуса табачной мозаики) или трансформированные при помощи рекомбинантных плазмидных экспрессионных векторов (например, Ti-плазмиды), содержащих соответствующую кодирующую последовательность; или клеточные системы животного происхождения, включая клетки млекопитающих (например, клетки HEK 293, СНО, Cos, HeLa, НКВ11 и ВНК).

В одном варианте реализации изобретения клеткой-хозяином является эукариотическая клетка. При употреблении в данном тексте эукариотическая клетка относится к любой животной или растительной клетке, имеющей сформированное ядро. Эукариотические клетки животных включают клетки позвоночных, например млекопитающих, и клетки беспозвоночных, например насекомых. Эукариотические клетки растений, в частности, могут без ограничений включать дрожжевые клетки. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например бактерии.

В некоторых вариантах реализации изобретения эукариотическая клетка является клеткой млекопитающего. Клеткой млекопитающего является любая клетка, полученная от млекопитающего. Клетки млекопитающих включают, в частности, но не ограничиваются этим, клеточные линии млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения клетка млекопитающего является клеткой человека. В другом варианте реализации изобретения клетка млекопитающего является клеткой HEK 293, которая принадлежит к клеточной линии из человеческих эмбриональных почек. Клетки HEK 293 предоставляются под маркировкой CRL-1533 американской коллекцией типовых культур, Манассас, Вирджиния, и под маркировкой клетки 293-Н, Каталог № 11631-017, или клетки 293-F, Каталог № 11625-019 Инвитроген (Карлсbad, Калифорния). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего является клеткой PER.C6®, которая принадлежит к человеческой клеточной линии, полученной из сетчатки. Клетки PER.C6® предоставляются Crucell (Лайден, Нидерланды). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего является клеткой яичников китайского хомячка (СНО - от англ. "Chinese hamster ovary"). Клетки СНО предоставляются американской коллекцией типовых культур, Манассас, Вирджиния, (например, СНО-K1; CCL-61). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего является клеткой почки новорожденного хомячка (ВНК - от англ. "baby hamster kidney"). Клетки ВНК предоставляются американской коллекцией типовых культур, Манассас, Вирджиния, (например, CRL-1632). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего является клеткой НКВ11, которая представляет гибридную клеточную линию из линий клеток HEK293 и человеческих В-клеток. Mei et al., Mol. Biotechnol. 34(2): 165-78 (2006).

В одном варианте реализации плазмида, кодирующая фрагмент ФВ или химерный белок, являющиеся объектами данного изобретения, дополнительно содержит селектируемый маркер, например, отвечающий за устойчивость к зеоцину, и трансфицируется в клетки HEK 293 для продуцирования фрагмента ФВ или химерного белка.

В другом варианте реализации первая плазмида, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок фактор VIII-Fc, и первый селектируемый маркер, например ген, отвечающий за устойчивость к зеоцину, и вторая плазмида, содержащая последовательность, кодирующую фрагмент ФВ-Fc, и второй селектируемый маркер, например ген, отвечающий за устойчивость к неомицину, котрансфицируются в клетки HEK 293 для создания гибрида фактор VIII-Fc - фрагмент ФВ-Fc. Первая и вторая плазмиды могут быть внесены в одинаковых количествах (т.е. в соотношении 1:1), либо они могут быть внесены в неодинаковых количествах.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая плазмида, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок фактор VIII-Fc, и первый селектируемый маркер, например ген, отвечающий

за устойчивость к зеоцину, и вторая плазмида, содержащая последовательность, кодирующую фрагмент ФВ-Fc, и второй селектируемый маркер, например ген, отвечающий за устойчивость к неомицину, и третья плазмида, содержащая последовательность, кодирующую протеинконвертазу (например, PC5 или фурин), и третий селектируемый маркер, например, ген, отвечающий за устойчивость к гигромицину, котрансфицируются в клетки HEK 293 для создания гибрида фактор VIII-фрагмент ФВ. Первая и вторая плазмиды могут быть внесены в одинаковых количествах (т.е. в молярном соотношении 1:1), либо они могут быть внесены в неодинаковых количествах. В определенных вариантах реализации изобретения первая плазмида, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок фактор VIII-Fc, последовательность, кодирующую фрагмент ФВ-Fc, и первый селектируемый маркер, например ген, отвечающий за устойчивость к зеоцину, и вторая плазмида, содержащая последовательность, кодирующую протеинконвертазу (например, PC5 или фурин), и второй селектируемый маркер, например ген, отвечающий за устойчивость к гигромицину, котрансфицируются в клетки HEK 293 для создания гибрида фактор VIII-фрагмент ФВ. В одном варианте реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательность Ф VIII-Fc и последовательность ФВ-Fc, могут быть соединены для того, чтобы кодировать один-единственный полипептид. В другом варианте реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательность Ф VIII-Fc и последовательность ФВ-Fc, могут кодировать две полипептидные цепи. Промоторы последовательности, кодирующей слитый белок фактор VIII-Fc, и последовательности, кодирующей фрагмент ФВ-Fc, могут быть разными либо одинаковыми.

В некоторых вариантах реализации изобретения плазмида, содержащая фурин, котрансфицируется с плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую Ф VIII-Fc, и/или последовательность, кодирующую ФВ-Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения белок фурин находится на той же плазмиде, которая содержит последовательность, кодирующую слитый белок Ф VIII-Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения белок фурин находится на той же плазмиде, которая содержит последовательность, кодирующую фрагмент ФВ-Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения белок фурин находится на отдельной плазмиде.

В других вариантах реализации изобретения трансфицированные клетки являются стабильно трансфицированными. Эти клетки могут быть собраны и сохранены в качестве стабильной клеточной линии при помощи традиционных методов, известных специалисту в данной области техники.

Клетки-хозяева, содержащие ДНК-конструкции белка, выращиваются в подходящей питательной среде. Употребляемый в данном тексте термин "подходящая питательная среда" обозначает среду, содержащую питательные вещества, необходимые для роста клеток. Питательные вещества, необходимые для роста клеток, могут включать источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины, минералы и факторы роста. В некоторых случаях среда может содержать один или более селективных факторов. В некоторых случаях среда может содержать телячью сыворотку или фетальную телячью сыворотку (ФТС). В одном варианте реализации изобретения среда практически не содержит IgG. В общем случае питательная среда рассчитана на клетки, содержащие ДНК-конструкцию, при помощи, например, отбора по чувствительности к лекарственному препаратору или дефициту незаменимого питательного вещества, которая дополнена селектируемым маркером на ДНК-конструкции или котрансфицируется с ДНК-конструкцией. Культивируемые клетки млекопитающих в общем случае выращиваются на коммерчески доступных содержащих сыворотку или бессывороточных средах (например, МЕМ, DMEM, DMEM/F12). В одном варианте реализации изобретения средой является CD293 (Инвитроген, Карлсбад, Калифорния). В другом варианте реализации изобретения средой является CD17 (Инвитроген, Карлсбад, Калифорния). Выбор среды, подходящей для конкретной применяемой клеточной линии, является стандартным навыком для специалиста в данной области техники.

Для того чтобы экспрессировать фрагмент ФВ и второй гетерологичный компонент или белок Ф VIII, клетки-хозяева культивируются в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии фрагмента ФВ и второго гетерологичного компонента или белка Ф VIII. Употребляемый в данном тексте термин "культивирование" относится к сохранению живых клеток *in vitro* на протяжении, по меньшей мере, определенного времени. Сохранение может, но не обязательно, включать рост популяции живых клеток. Например, сохраняемые в культуре клетки могут иметь статическую популяцию, но при этом жизнеспособными и способными к продуцированию необходимого продукта, например рекомбинантного белка или рекомбинантного слитого белка. Условия, подходящие для культивирования эукариотических клеток, хорошо известны в данной области техники и включают подходящий выбор питательной среды, добавок к среде, температуры, уровня pH, насыщения кислородом и т.п. В коммерческих целях культивирование может включать использование любых из множества типов систем для расширения масштаба, включая шуттль-аппараты, роллерные фляконы, биореакторы с полыми волокнами, биореакторы с механическим перемешиванием, эрлифтные биореакторы, волновые биореакторы и другие.

Условия культивирования клеток также выбираются таким образом, чтобы обеспечить возможность связывания фрагмента ФВ со вторым гетерологичным компонентом или белком Ф VIII. Условия, которые обеспечивают возможность экспрессии фрагмента ФВ и/или белка Ф VIII, могут включать наличие источника витамина K. Например, в одном варианте реализации изобретения стабильно трансфициро-

ванные клетки HEK 293 культивируются в среде CD293 (Инвитроген, Карлсbad, Калифорния) или в среде OptiCHO (Инвитроген, Карлсbad, Калифорния), дополненной 4 мМ глутамина.

В одном аспекте реализации настоящее изобретение относится к способу экспрессии, создания или получения фрагмента ФВ, являющегося объектом изобретения, включающему а) трансфекцию клетки-хозяина полинуклеотидом, кодирующим фрагмент ФВ, и б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии фрагмента ФВ, при этом фрагмент ФВ экспрессируется. В одном варианте реализации изобретение относится к способу получения зрелого белка ФВ или его фрагмента, включающему, а) трансфекцию клетки-хозяина первым полинуклеотидом, кодирующим белок ФВ или его фрагмент, который сшит с препептидом ФВ, и вторым полинуклеотидом, кодирующим протеинконвертазу, например PC5, PC7 или фурин, и б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии зрелого белка ФВ или его фрагмента. Полинуклеотид, кодирующий белок ФВ или его фрагмент, также может быть сшит с препептидом ФВ. Последовательность препептида может отщепляться во время внесения в эндоплазматический ретикулум перед секрецией.

В другом аспекте реализации данное изобретение относится к способу экспрессии, создания или получения химерного белка, содержащего фрагмент ФВ, связанный или соединенный с гетерологичным компонентом белка Ф VIII, включающему а) трансфекцию одной или более клеток-хозяев полинуклеотидом или группой полинуклеотидов, кодирующими химерный белок, и б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка. В одном варианте реализации изобретение относится к способу экспрессии, создания или получения химерного белка, включающему а) трансфекцию клетки-хозяина первым полинуклеотидом, кодирующим фрагмент ФВ, связанный с гетерологичным компонентом, и вторым полинуклеотидом, кодирующим белок Ф VIII, связанный с гетерологичным компонентом, и б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка. Первый полинуклеотид и второй полинуклеотид могут находиться в одном векторе или в двух векторах. В другом варианте реализации изобретение относится к способу экспрессии, создания или получения химерного белка, включающему а) трансфекцию клетки-хозяина первым полинуклеотидом, кодирующим фрагмент ФВ, связанный с гетерологичным компонентом, вторым полинуклеотидом, кодирующим белок Ф VIII, связанный с гетерологичным компонентом, и третьим полинуклеотидом, кодирующим протеинконвертазу, и б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка. В других вариантах реализации изобретение относится к способу экспрессии, создания или получения химерного белка, включающему а) трансфекцию клетки-хозяина первым полинуклеотидом, кодирующим фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3, связанный с гетерологичным компонентом, вторым полинуклеотидом, кодирующим белок Ф VIII, связанный с гетерологичным компонентом, и третьим полинуклеотидом, кодирующим домен D1 и домен D2 ФВ, и б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка. В одном варианте реализации изобретения первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и третий полинуклеотид могут находиться в одном векторе или в разных векторах. В другом варианте реализации изобретения первый полинуклеотид и второй полинуклеотид могут находиться в одном векторе, а третий полинуклеотид может находиться в другом векторе. В других вариантах реализации изобретения первый полинуклеотид и третий полинуклеотид могут находиться в одном векторе, а второй полинуклеотид может находиться в другом векторе. В некоторых вариантах реализации изобретения второй полинуклеотид и третий полинуклеотид могут находиться в одном векторе, а первый полинуклеотид может находиться в другом векторе.

В дополнительных вариантах реализации изобретения белковый продукт, содержащий фрагмент ФВ или химерный белок, содержащий фрагмент ФВ, секретируется в среду. Среду отделяют от клеток, концентрируют, фильтруют, а затем пропускают через две или три колонки для аффинной хроматографии, например колонку протеина А и одну или более анионообменных колонок.

В определенных аспектах реализации настоящее изобретение относится к полипептиду фрагмента ФВ или химерного белка, получаемому описанными в данном тексте способами.

In vitro производство дает возможность для расширения масштаба для получения больших количеств необходимых измененных полипептидов, являющихся объектами данного изобретения. Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях тканевого культивирования известны в данной области техники и включают гомогенное супензионное культивирование, например, в эрлифтном реакторе или реакторе с механическим перемешиванием для непрерывного культивирования, или культивирование иммобилизованных или обездвиженных клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на арагозных микрограмнлах или пьезокерамических головках. При необходимости и/или при желании растворы полипептидов могут быть очищены при помощи принятых хроматографических методов, например гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ХГВ), хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе или аффинной хроматографии.

Фармацевтический состав.

Составы, содержащие фрагмент ФВ или химерный белок, являющиеся объектами настоящего изобретения, могут содержать подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Например, они могут

содержать наполнители и/или вспомогательные вещества, которые способствуют превращению активных компонентов в препараты, предназначенные для доставки в место действия.

Фармацевтический состав может быть приготовленным для парентерального введения (т.е. внутривенного, подкожного или внутримышечного) при помощи болюсной инъекции. Лекарственная форма для инъекции может быть представлена в виде единичной дозировки, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с добавлением консерванта. Составы могут иметь вид суспензий, растворов или эмульсий на основе масляных или водных растворителей и содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В альтернативном варианте активный ингредиент может находиться в виде порошка для соединения с подходящим растворителем, например апирогенной водой.

Подходящие лекарственные формы для парентерального введения также включают водные растворы активных компонентов в водорастворимой форме, например водорастворимые соли. Вдобавок, могут применяться суспензии активных компонентов в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или среды включают жирные масла, например кунжутное масло, или эфиры синтетических жирных кислот, например этилолеат или триглицериды. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натриевую карбоксиметилцеллюлозу, сорбитол и декстрозу. В некоторых случаях суспензия также может содержать стабилизаторы. Также могут использоваться липосомы для инкапсуляции молекул, являющихся объектами данного изобретения, для доставки их в клетки или интерстициальное пространство. Примерами фармацевтически приемлемых носителей являются физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые вещества, изотонические и замедляющие всасывание вещества, вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстроза, глицерол, этанол и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит изотонические вещества, например сахара, полиспирты, такие как маннитол, сорбитол, или хлорид натрия. В других вариантах реализации изобретения составы содержат фармацевтически приемлемые вещества, такие как смаивающие вещества, или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смаивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, которые повышают срок годности или эффективность активных ингредиентов.

Составы, являющиеся объектами данного изобретения, могут находиться в различных формах, включая, например, жидкость (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии, суспензии, полутвердые и твердые дозировочные формы. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения.

Состав может быть изготовлен в виде раствора, микроэмulsionи, дисперсии, липосомной или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного препарата. Стерильные растворы для инъекций можно изготовить путем внесения необходимого количества активного ингредиента в подходящий растворитель, в случае необходимости с одним или комбинацией вышеперечисленных ингредиентов, с последующей фильтрующей стерилизацией. В общем случае дисперсии изготавливают путем внесения активного ингредиента в стерильный растворитель, который содержит базовую дисперсную среду и другие необходимые ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами изготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которая на выходе дает порошок из активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из исходного стерильно-отфильтрованного раствора. Необходимую текучесть раствора можно сохранить, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем сохранения необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание составов для инъекций может быть достигнуто путем включения в состав вещества, которое замедляет всасывание, например, солей моностеарата или желатина.

Активный ингредиент может быть изготовлен так, чтобы иметь форму приспособление для контролируемого высвобождения. Примеры таких лекарственных форм и приспособлений включают импланты, трансдермальные пластиры и микроинкапсулированные системы доставки. Могут применяться биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полилактидная кислота. Способы изготовления таких лекарственных форм и приспособлений известны в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Депо лекарственных препаратов для инъекций может быть создано путем образования микроинкапсулированных матриц препаратов в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения препарата и полимера и природы применяемого полимера можно контролировать скорость высвобождения препарата. Другими примерами биоразлагаемых полимеров являются полиортоэфиры и полиангидриды. Депо лекарственных препаратов для инъекций может быть изготовлено путем заключения препарата в липосомы или микроэмulsionи.

В составы могут включаться дополнительные активные соединения. В одном варианте реализации фрагмент ФВ или химерный белок, являющиеся объектами данного изобретения, изготавливается вместе

с другим фактором свертывания крови или его вариантом, фрагментом, аналогом или производным. Например, факторы свертывания крови включают, но не ограничиваются этим, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протромбин, фибриноген, фактор Виллебранда или рекомбинантный растворимый тканевой фактор (ррТФ) либо активированные формы любого из предыдущих веществ. Фактор свертывания крови гемостатического средства также может содержать антифибринолитические препараты, например эпсилон-амино-капроновую кислоту, транексамовую кислоту.

Схемы приема лекарственных препаратов можно подобрать таким образом, чтобы они обеспечивали оптимальный необходимый ответ. Например, можно вводить единичную болюсную дозу, можно вводить несколько отдельных доз в течение продолжительного периода или дозы можно пропорционально уменьшать или увеличивать как того требует терапевтическая ситуация. Парентеральные составы удобно изготавливать в виде единичной дозировки для облегчения введения и постоянства дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

Дополнительно к активному соединению жидкую форму дозировки может содержать инертные ингредиенты, такие как вода, этиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, глицерол, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот или сорбитан.

Неограничивающие примеры подходящих фармацевтических носителей также описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences авторства E.W. Martin. Некоторые примеры наполнителей включают крохмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силиконовый гель, стеарат натрия, глицерол моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерол, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. Состав также может содержать pH буферные реагенты и смачивающие или эмульгирующие вещества.

Для перорального введения фармацевтический состав может иметь форму таблеток или капсул, изготовленных стандартными способами. Также состав может быть изготовлен в виде жидкости, например сиропа или суспензии. Жидкость может содержать суспендирующие вещества (например, сорбитный сироп, производные целлюлозы или гидрогенезированные пищевые жиры), эмульгирующие вещества (лецитин или гуммиарабик), неводные растворители (например, миндальное масло, жирные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновую кислоту). Препараты также могут содержать ароматизирующие, окрашивающие вещества и подсластители. В альтернативном варианте состав может представлять собой сухой продукт для соединения с водой либо другим подходящим растворителем.

Для buccalного введения состав может иметь форму таблеток или леденцов в соответствии с стандартными протоколами.

Для введения путем ингаляции соединения для применения согласно настоящему изобретению обычно доставляются в форме распыляемого аэрозоля с или без наполнителей или в форме спрей-аэрозоля из аэрозольной упаковки или ингалятора, в некоторых случаях с пропеллером, например дихлордиформетаном, трихлордиформетаном, дихлортетраформетаном, двуокисью углерода или другим подходящим газом. В случае аэрозольной упаковки единичная дозировка может быть определена, если нажатие клапана приводит к выделению дозированного количества вещества. Капсулы и картриджи, к примеру, из желатина для использования в ингаляторе или инжекторе можно изготовить с содержанием порошкообразной смеси из соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Также можно изготовить фармацевтический состав для ректального введения в виде суппозитория или микроклизмы с удержанием, например, с содержанием обычных основ для суппозитория, таких как кокосовое масло или другие глицериды.

Генная терапия.

Фрагмент ФВ или содержащий его химерный белок, являющиеся объектами данного изобретения, могут продуцироваться *in vivo* в организме млекопитающего, например пациента-человека, при применении терапевтически эффективных подходов генной терапии в лечении заболевания или нарушения, связанного с кровотечением, выбранного из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, кровоизлияния в брюшную полость, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В одном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение, связанное с кровотечением, является гемофилией. В другом варианте реализации изобретения заболевание или нарушение, связанное с кровотечением, является гемофилией А.

Лечение включает введение подходящего фрагмента ФВ или нукleinовой кислоты, кодирующей химерный белок, функционально связанной с подходящей управляющей экспрессией последовательностью. В определенном варианте реализации изобретения эти последовательности включены в вирусный

вектор. Подходящие вирусные векторы для указанной генной терапии включают аденоавирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусные векторы, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе вируса простого герпеса и аденоассоциированные вирусные (AAB) векторы. Вирусный вектор может являться дефектным по репликации вирусным вектором. В других вариантах реализации изобретения аденоавирусный вектор содержит делецию в гене E1 или в гене E3. При применении аденоавирусного вектора организм млекопитающего можно не подвергать обработке нуклеиновой кислотой, кодирующей ген селектируемого маркера. В других вариантах реализации изобретения последовательности включены в невирусный вектор, известный специалистам в данной области техники.

Способы применения фрагмента ФВ или химерного белка.

Один аспект реализации настоящего изобретения относится к предотвращению или подавлению взаимодействия Ф VIII с эндогенным ФВ путем блокирования или экранирования ФВ-связывающего участка на Ф VIII от эндогенного ФВ. В одном варианте реализации изобретение относится к способу создания белка Ф VIII, который имеет время полужизни большее, чем Ф VIII дикого типа, или мономерно-димерного гибрида Ф VIII, при этом способ включает ковалентное соединение дополнительного компонента с белком Ф VIII, тем самым создавая химерный белок, содержащий белок Ф VIII и дополнительный компонент, причем дополнительный компонент экранирует или предотвращает взаимодействие белка Ф VIII с эндогенным ФВ. Химерный белок, применяемый в данном способе, включает один или более описанных в данном тексте химерных белков.

Другой аспект реализации изобретения включает способ введения нуждающемуся в этом пациенту белка Ф VIII, который имеет время полужизни большее, чем Ф VIII дикого типа, или мономерно-димерного гибрида Ф VIII, который состоит из двух полипептидных цепей, с первой цепью, состоящей из аминокислотной последовательности, кодирующей Ф VIII и Fc-область, и второй цепью, состоящей из Fc-области, при этом способ включает введение описанного в данном тексте фрагмента ФВ или описанного в данном тексте химерного белка пациенту. Аминокислотная последовательность Ф VIII в мономерно-димерном гибридном может являться последовательностью Ф VIII или Ф VIII дикого типа.

В одном варианте реализации изобретение относится к способу применения вспомогательного компонента, например описанного в данном тексте фрагмента ФВ или химерного белка, содержащего фрагмент ФВ, для того, чтобы предотвратить или подавить взаимодействие эндогенного ФВ с белком Ф VIII. В другом варианте реализации изобретения белок Ф VIII, который способен взаимодействовать с фрагментом ФВ, является эндогенным Ф VIII. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII, который способен взаимодействовать с фрагментом ФВ, является составом Ф VIII, который вводится пациенту отдельно, до или после либо одновременно с фрагментом ФВ или химерным белком, содержащим фрагмент ФВ. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII, который способен связываться с фрагментом ФВ, является составом Ф VIII, который вводится пациенту вместе с фрагментом ФВ или химерным белком. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII, который способен связываться с фрагментом ФВ, является Ф VIII, присутствующим с фрагментом ФВ или соединенным с фрагментом ФВ в химерном белке. Органент ФВ или химерный белок, содержащий фрагмент ФВ, связывается или соединен с белком Ф VIII и, таким образом, продлевает время полужизни белка Ф VIII, связанного с фрагментом ФВ или химерным белком. Белок Ф VIII, связанный с фрагментом ФВ или химерным белком, экранирован или защищен от процесса выведения ФВ и, таким образом, характеризуется сниженным выведением по сравнению с белком Ф VIII, не связанным с фрагментом ФВ или химерным белком. Таким образом, экранированный белок Ф VIII имеет большее время полужизни чем белок Ф VIII, не связанный или не соединенный с фрагментом ФВ или химерным белком. В определенных вариантах реализации изобретения белок Ф VIII, соединенный с или защищенный фрагментом ФВ или химерным белком, являющимися объектами данного изобретения, не выводится клиренс-рецепторами ФВ. В других вариантах реализации изобретения белок Ф VIII, соединенный с или защищенный фрагментом ФВ или химерным белком, выводится из системы медленнее, чем белок Ф VIII, не соединенный с или не защищенный фрагментом ФВ.

В одном аспекте реализации фрагмент ФВ, являющийся объектом данного изобретения, или содержащий его химерный белок характеризуется сниженным выведением из циркуляции, так как данный фрагмент ФВ или химерный белок не содержит участок связывания клиренс-рецепторов ФВ. Фрагмент ФВ предотвращает или подавляет выведение из системы Ф VIII, связанного или соединенного с фрагментом ФВ, в процессе очистки ФВ. Применяемые в настоящем изобретении фрагменты ФВ также могут обеспечивать по меньшей мере одно или более из ФВ-подобных Ф VIII-защитных свойств, которые обеспечиваются эндогенным ФВ. В определенных вариантах реализации изобретения фрагменты ФВ также могут маскировать один или более из участков связывания клиренс-рецепторов Ф VIII, тем самым предотвращая выведение Ф VIII в процессе его собственной очистки.

В другом аспекте реализации фрагмент ФВ или химерный белок, являющиеся объектами данного изобретения, можно применять для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, связанного с болезнью Виллебранда (БВ) типа 2N. БВ типа 2N является качественным дефектом ФВ, который есть следствие нарушения связывания ФВ с Ф VIII, и в результате приводит к низким уровням циркули-

рующего Ф VIII. Следовательно, фрагмент ФВ или химерный белок, являющиеся объектами данного изобретения, путем связывания с или будучи связанными с белком Ф VIII, не только стабилизируют белок Ф VIII, но также предотвращают выведение белка Ф VIII из циркуляции.

В некоторых вариантах реализации изобретения предотвращение или подавление связывания белка Ф VIII с эндогенным ФВ фрагментом ФВ или химерным белком может происходить *in vitro* или *in vivo*.

Также предложен способ увеличения времени полужизни белка Ф VIII, включающий введение фрагмента ФВ или химерного белка, содержащего фрагмент ФВ, и белка Ф VIII нуждающемуся в этом пациенту. Время полужизни неактивированного Ф VIII, связанного или соединенного с полноразмерным ФВ, в плазме крови составляет от 12 до 14 ч. При БВ типа 3, когда в циркуляции практически отсутствует ФВ, время полужизни Ф VIII составляет всего около 6 ч, что приводит к появлению у таких пациентов симптомов легкой или умеренной формы гемофилии А по причине пониженных концентраций Ф VIII. Время полужизни белка Ф VIII, связанного или соединенного с фрагментом ФВ, являющимся объектом настоящего изобретения, может возрастать по меньшей мере приблизительно в 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 или 4,0 раза по сравнению со временем полужизни неактивированного Ф VIII, связанного или соединенного с полноразмерным ФВ. В одном варианте реализации изобретения время полужизни белка Ф VIII, связанного или соединенного с фрагментом ФВ в химерном белке возрастает по меньшей мере приблизительно в 2, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению со временем полужизни неактивированного Ф VIII, связанного или соединенного с полноразмерным ФВ. В другом варианте реализации изобретения время полужизни белка Ф VIII, связанного или соединенного с фрагментом ФВ в химерном белке возрастает в от около 2 до около 5 раз, от около 3 до около 10 раз, от около 5 до около 15 раз, от около 10 до около 20 раз, от около 15 до около 25 раз, от около 20 до около 30 раз, от около 25 до около 35 раз, от около 30 до около 40 раз, от около 35 до около 45 раз по сравнению со временем полужизни неактивированного Ф VIII, связанного или соединенного с полноразмерным ФВ. В конкретном варианте реализации изобретения время полужизни белка Ф VIII, связанного или соединенного с фрагментом ФВ в химерном белке, возрастает по меньшей мере в около 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 раз по сравнению со временем полужизни Ф VIII дикого типа у мышей с двойным Ф VIII- и ФВ-генным нокаутом. В некоторых вариантах реализации изобретения время полужизни химерного белка, содержащего фрагмент ФВ, сшитый с первым гетерологичным компонентом, например первой Fc-областью, и белок Ф VIII, связанный со вторым гетерологичным компонентом, например второй Fc-областью, превышает время полужизни химерного белка, содержащего белок Ф VIII и две Fc-области, где белок Ф VIII связан с одной из двух Fc-областей (т.е. мономерно-димерный гибрид Ф VIII). В других вариантах реализации изобретения время полужизни химерного белка, содержащего фрагмент ФВ, сшитый с первым гетерологичным компонентом, например первой Fc-областью, и белок Ф VIII, связанный со вторым гетерологичным компонентом, например второй Fc-областью, превышает по меньшей мере в около 1,5, 2, 2,5, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,5 или 5,0 раз время полужизни химерного белка, содержащего белок Ф VIII и две Fc-области, где белок Ф VIII связан с одной из двух Fc-областей (т.е. мономерно-димерный гибрид Ф VIII). В некоторых вариантах реализации результатом изобретения является продление времени полужизни белка Ф VIII по сравнению с белком Ф VIII без фрагмента ФВ или Ф VIII дикого типа. Время полужизни белка Ф VIII по меньшей мере в 1,5, по меньшей мере в 2, по меньшей мере в 2,5, по меньшей мере в 3, по меньшей мере в 4, по меньшей мере в 5, по меньшей мере в 6, по меньшей мере в 7, по меньшей мере в 8, по меньшей мере в 9, по меньшей мере в 10, по меньшей мере в 11 или по меньшей мере в 12 раз больше, чем время полужизни белка Ф VIII без фрагмента ФВ. В одном варианте реализации изобретения время полужизни Ф VIII приблизительно 1,5-20-кратно, приблизительно 1,5-15-кратно или приблизительно 1,5-10-кратно превышает время полужизни Ф VIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения время полужизни Ф VIII продлено в от около 2 до около 10 раз, от около 2 до около 9 раз, от около 2 до около 8 раз, от около 2 до около 7 раз, от около 2 до около 6 раз, от около 2 до около 5 раз, от около 2 до около 4 раз, от около 2 до около 3 раз, от около 2,5 до около 10 раз, от около 2,5 до около 9 раз, от около 2,5 до около 8 раз, от около 2,5 до около 7 раз, от около 2,5 до около 6 раз, от около 2,5 до около 5 раз, от около 2,5 до около 4 раз, от около 2,5 до около 3 раз, от около 3 до около 10 раз, от около 3 до около 9 раз, от около 3 до около 8 раз, от около 3 до около 7 раз, от около 3 до около 6 раз, от около 3 до около 5 раз, от около 3 до около 4 раз, от около 4 до около 6 раз, от около 5 до около 7 раз или от около 6 до около 8 раз по сравнению с Ф VIII дикого типа или белком Ф VIII без фрагмента ФВ. В других вариантах реализации изобретения время полужизни Ф VIII составляет 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 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч. В других вариантах реализации изобретения время полужизни Ф VIII составляет от около 15 ч до около двух недель, от

около 16 ч до около одной недели, от около 17 ч до около одной недели, от около 18 ч до около одной недели, от около 19 ч до около одной недели, от около 20 ч до около одной недели, от около 21 ч до около одной недели, от около 22 ч до около одной недели, от около 23 ч до около одной недели, от около 24 ч до около одной недели, от около 36 ч до около одной недели, от около 48 ч до около одной недели, от около 60 ч до около одной недели, от около 24 ч до около шести дней, от около 24 ч до около пяти дней, от около 24 ч до около четырех дней, от около 24 ч до около трех дней или от около 24 ч до около двух дней.

В некоторых вариантах реализации изобретения среднее время полужизни Ф VIII у пациента составляет около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24 ч (1 дня), около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 40, около 44, около 48 ч (2 дней), около 54, около 60, около 72 ч (3 дней), около 84, около 96 ч (4 дней), около 108, около 120 ч (5 дней), около шести дней, около семи дней (одной недели), около восьми дней, около девяти дней, около 10 дней, около 11 дней, около 12 дней, около 13 дней или около 14 дней.

В конкретном варианте реализации время полужизни химерного белка,

являющегося объектом данного изобретения, примерно в два раза больше, чем время полужизни Ф VIII дикого типа или Ф VIII с удаленным В-доменом. В другом варианте реализации изобретения время полужизни химерного белка примерно в три раза больше, чем время полужизни Ф VIII дикого типа или Ф VIII с удаленным В-доменом.

В изобретении дополнительно предложен способ лечения или предотвращения заболевания или нарушения, связанного с кровотечением, включающий введение эффективного количества фрагмента ФВ или химерного белка (например, химерного белка, содержащего фрагмент ФВ, связанный с первым гетерологичным компонентом, например первой Fc-областью, и белок Ф VIII, связанный со вторым гетерологичным компонентом, например второй Fc-областью, где фрагмент ФВ связан или соединен с белком Ф VIII). В одном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение, связанное с кровотечением, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, кровоизлияния в брюшную полость, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В конкретном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение, связанное с кровотечением, является гемофилией А.

Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что фрагмент ФВ и химерный белок, содержащий дополнительный компонент, например описанный в данном тексте фрагмент ФВ, и белок Ф VIII, изготовленный согласно изобретению, имеют много применений, включая, но не ограничиваясь этим, способы лечения пациента с нарушением гемостатики и способы лечения нуждающегося в общем гемостатическом средстве пациента. В одном варианте реализации изобретение относится к способу лечения пациента с нарушением гемостатики, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества фрагмента ФВ или химерного белка.

Часть белка Ф VIII в составе химерного белка излечивает или предотвращается нарушение гемостатики, выполняя роль кофактора фактору IX на негативно заряженной фосфолипидной поверхности, образуя, тем самым, комплекс Хазы. Связывание активированных факторов свертывания крови с фосфолипидной поверхностью локализирует этот процесс на поврежденных участках сосуда. На фосфолипидной поверхности фактор VIIa повышает максимальную скорость активации фактора X фактором I Xa приблизительно в 200000 раз, что приводит к второй большой волне образования тромбина.

Химерный белок, содержащий дополнительный компонент, например фрагмент ФВ, и белок Ф VIII, можно применять для лечения любого нарушения гемостатики. Нарушения гемостатики, которые могут лечиться введением химерного белка, являющегося объектом данного изобретения, включают, но не ограничиваются этим, гемофилию А, а также дефицит или структурные аномалии в отношении фактора VIII. В одном варианте реализации изобретения нарушение гемостатики является гемофилией А.

Химерный белок, содержащий дополнительный компонент, например фрагмент ФВ, и белок Ф VIII, можно применять профилактически для лечения пациента с нарушением гемостатики. Химерный белок, являющийся объектом данного изобретения, можно применять для лечения острых случаев кровотечения у пациента с нарушением гемостатики. В другом варианте реализации изобретения нарушение гемостатики может быть результатом дефектности фактора свертывания крови, например фактора Виллебранда. В одном варианте реализации изобретения нарушение гемостатики является наследственным нарушением. В другом варианте реализации изобретения нарушение гемостатики является приобретенным нарушением. Приобретенное нарушение может являться следствием первопричинного заболевания или состояния. Состоянием, не связанным с заболеванием, в качестве примера, но не ограничения, может являться рак, аутоиммунное заболевание или беременность. Приобретенное нарушение может являться следствием преклонного возраста или медикаментозного лечения первопричинного заболевания (напри-

мер, химиотерапии при раке).

Изобретение также относится к способам лечения пациента, который не имеет врожденного нарушения гемостатики, но имеет первопричинное заболевание или состояние, которое приводит к появлению нарушения гемостатики, например, вследствие выработки антител к Ф VIII или хирургической операции. Таким образом, изобретение относится к способу лечения нуждающегося в общем гемостатическом средстве пациента, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества химерного белка, содержащего фрагмент ФВ и белок Ф VIII, изготовленного согласно представленным способам.

Настоящее изобретение также относится к способам снижения иммуногенности Ф VIII или индуцирования меньшей иммуногенности против Ф VIII, включающим введение эффективного количества описанного в данном тексте фрагмента ФВ, описанных в данном тексте химерных белков или кодирующих их полинуклеотидов.

В одном варианте реализации изобретения пациенту, нуждающемуся в общем гемостатическом средстве, проводят или собираются проводить хирургическую операцию. Химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, можно применять до, во время или после хирургической операции в качестве профилактики. Химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, можно применять до, во время или после хирургической операции для контроля острой случаев кровотечения.

Химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, можно применять для лечения острой случаев кровотечения у пациента без нарушения гемостатики. Острые случаи кровотечения могут являться следствием тяжелой травмы, например хирургической операции, автомобильной катастрофы, ранения, проникающего огнестрельного ранения или любого травматического происшествия, которое приводит к неконтролируемому кровотечению. Неограничивающие примеры случаев кровотечения включают нарушение свертываемости крови, гемартроз, мышечное кровотечение, кровотечение в полости рта, кровоизлияние, кровоизлияние в мышцы, кровоизлияние в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, кровоизлияние в брюшную полость, внутригрудное кровоизлияние, переломы костей, кровотечение в центральной нервной системе, кровотечение в заглоточном пространстве, кровотечение в забрюшинном пространстве, кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и любые их комбинации.

При профилактических применениях один или более составов, содержащих химерный белок или фрагмент ФВ, являющиеся объектами данного изобретения, либо их смесь вводят пациенту, у которого еще не наблюдается болезненного состояния, для того, чтобы повысить устойчивость пациента или облегчить симптомы, связанные с заболеванием или нарушением. Такое количество препарата определяется как "эффективная профилактическая доза". При терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая дозировка (например, от 1 до 400 мг/кг полипептида на дозу, при этом дозировки в диапазоне от 5 до 25 мг являются более общеподходящими для радиоиммуноконьюгатов и более высокие дозы для полипептидов, модифицированных цитотоксичными препаратами) при относительно коротких интервалах до того времени, пока прогрессирование заболевания снижается или закончится, и пока у пациента не появятся признаки частичного либо полного уменьшения интенсивности симптомов заболевания. После этого пациент может быть переведен на профилактический режим.

В некоторых вариантах реализации химерный белок, фрагмент ФВ или состав, являющиеся объектами данного изобретения, применяются для лечения по требованию, которое включает лечение случая кровотечения, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, кровоизлияния в брюшную полость, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве или кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Пациент может нуждаться в оперативной профилактике, периоперативной терапии или лечении для осуществления хирургической операции. Такие хирургические операции включают, например, малые хирургические операции, обширные хирургические операции, удаление зубов, тонзилэктомию, паховое грыжесечение, синовэктомию, полную замену коленного сустава, краниотомию, остеосинтез, травматическую хирургию, внутричерепную хирургию, внутрибрюшинную хирургию, внутригрудную хирургию или операции по протезированию суставов.

В одном варианте реализации изобретения химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, вводится внутривенно, подкожно, внутримышечно или через любую слизистую поверхность, например, перорально, подъязычно, бокально, назально, ректально, вагинально или через легочные дыхательные пути. Химерный белок, содержащий фрагмент ФВ и белок Ф VIII, может находиться в составе или быть связанным с биополимерным твердофазным носителем, что дает возможность медленного высвобождения химерного белка в месте кровотечения, или находиться в составе пропитки бандажа/повязки. Дозировка химерного белка, содержащего фрагмент ФВ и белок Ф VIII, будет варьироваться в зависимости от пациента и от конкретно применяемого способа введения. Дозировки могут находиться в диапазоне от 0,1 до 100000 мкг/кг массы тела. В одном варианте реализации изобретения диапазон дозировок составляет 0,1-1000 мкг/кг. В другом варианте реализации изобретения диапазон дозировок со-

ставляет 0,1-500 мкг/кг. Белок может вводиться в непрерывном режиме или через определенные временные интервалы. Для определения оптимальных диапазонов дозировок и/или графиков введения препаратов можно применять методы *in vitro* аналитики. Методы *in vitro* аналитики для измерения активности фактора свертывания крови известны в данной области техники, например это анализ коагулирующей активности VIIa-rTF STA-CLOT или анализ коагулирующей активности РОТЭМ. Вдобавок, эффективные дозировки могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных при испытаниях на животных моделях, например на собаках с гемофилией (Mount et al. 2002, Blood 99(8):2670).

После детального описания настоящего изобретения его содержание станет более понятным с отсылкой на нижеприведенные примеры, которые включены в данный текст исключительно в иллюстративных целях и не ограничивают данное изобретение. Все патенты и публикации, упоминаемые в данном тексте, включены в прямой форме посредством ссылки.

Примеры

Во всех примерах, если не указано иное, применяли нижеприведенные материалы и способы.

Материалы и способы.

В общем случае в осуществлении настоящего изобретения применяют, если не указано иное, общепринятые методы химии, биофизики, молекулярной биологии, рекомбинантной ДНК-технологии, иммунологии (в частности, например, технологии антител) и стандартные методы электрофореза. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., CS.H.L. Press, Pub. (1999); и Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

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

(а) Клонирование pSYN-ФВ-001, 002, 003 и 004.

pSYN-ФВ от 001 до 004 содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты ФВ, которыми являются аминокислоты 1-276 (001), аминокислоты 1-477 (002), аминокислоты 1-511 (003) и аминокислоты 1-716 (004) белковой последовательности ФВ-D'D3A. Следующая нумерация аминокислот представляет последовательность зрелого ФВ без пропептида и соответствует аминокислотам 764-1039 (001), аминокислотам 764-1240 (002), аминокислотам 764-1274 (003) и аминокислотам 764-1479 (004) из SEQ ID NO: 2 соответственно. Все четыре конструкции содержат сигнальный пептид Ф VIII при N-конце, что делает возможной необходимую секрецию синтезированного белка, за которым следует метка 6xHis при C-конце, которая используется для очистки белка. Вышеприведенные конструкции синтезировали при помощи следующих комбинаций праймеров:

pSYN ФВ- 001:

ESC48- Прям. - ФВ-D'D3 с сигналом VIII и сайтом BsiW1

TCGCGACGTACGGCGCCACCATGCAAATAGAGCTCCACCTGCTTCTGTGC

CTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG(SEQIDNO: 57)

ESC50- Обратн.- ФВ- частичный D'D3 (аминокислоты 1-276) с сайтом 6 His и Not1

TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTATGATGCAGAGGCAC

TCAGCACACTG(SEQIDNO: 58)

pSYN ФВ- 002:

ESC48- Прям. - ФВ-D'D3 с сигналом VIII и сайтом BsiW1

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTCTGTGC
CTTTTGCATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG(SEQIDNO: 59)

ESC51- Обратн.- ФВ D'D3 (аминокислоты 1-477) с сайтом 6 His и Not1

TGACCTCGAGCGGGCGCTCAGTGGTATGGTATGCGGCTCCTGGCAGGCTTCA
CAGGTGAGGTTGACAAC(SEQIDNO: 60)

pSYN ФВ- 003:**ESC48- Прям. - ФВ-D'D3 с сигналом VIII и сайтом BsiW1**

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTCTGTGC
CTTTTGCATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG(SEQIDNO: 61)

ESC52- Обратн.-ФВ-D'D3 PartialA1 (аминокислоты 1-511) с сайтом 6 His и Not1

TGACCTCGAGCGGGCGCTCAGTGGTATGGTATGCGCTGCTGCAGTAGAAATCG
TGCAACGGCGGTT(SEQIDNO: 62)

pSYN ФВ- 004:**ESC48- Прям. - ФВ-D'D3 с сигналом VIII и сайтом BsiW1**

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTCTGTGC
CTTTTGCATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG(SEQIDNO:63)

ESC53-Обратн.- ФВ-D'D3A1 (аминокислоты 1-716) с сайтом 6 His и Not1

TGACCTCGAGCGGGCGCTCAGTGGTATGGTATGGCCCACAGTGACTTGTGCC
ATGTGGGG(SEQIDNO: 64)

Предполагается, что белки из конструкций ФВ-001, 002, 003 и 004 существуют в виде мономера.

Реакцию ПЦР проводили в 50 мкл с комбинациями праймеров ESC 48/ESC50, ESC 48/ESC51, ESC 48/ESC52, ESC48/ESC53 и полноразмерной ФВ-плазмидой в качестве матрицы, используя двухэтапный цикл ПЦР-амплификации: 94°C 2 мин; 21 цикл с (96°C 30 с, 68°C 2 мин). Полосы правильного размера (~960 п.н.о. для ФВ-001; 1460 для ФВ-002, 1520 п.н.о. для ФВ-003; и 2150 п.н.о. для ФВ-004) очищали гелем при помощи Gel Extraction kit (Киаген (Qiagen), Валенсия, Калиф.) и клонировали в сайты рестрикций BsiWI и Not1 пЦДНК 4 для получения pSYN-ФВ-001,002,003 и 004 соответственно.

(б) Клонирование pSYN-ФВ-006.

pSYN-ФВ-006 содержит домен D1D2D'D3-CK (от англ. "cysteine knot") ФВ.

Для клонирования этой конструкции использовали синтез фрагмента ДНК, содержащего часть домена D3 и домена CK (Genscript - идентификационный номер последовательности 122026, показано ниже). Фрагмент конструкции Genscript субклонировали в расщепленную BamH1/EcoRV pSYN-ФВ 008, т.е. вектор, кодирующий полноразмерный ФВ.

Genscript - номер последовательности 122026 (SEQ ID NO: 65).

```
GGATCCTAGTGGGAATAAGGGATGCCAGCCACCCCTCAGTGAATGCAAGAACGGGTCAACATCCTGGTG  
GAGGGAGGAGAGATTGAGCTGTTGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCCATGAAGGATGAGACTCACTT  
TGGAGTGGTGGAGTCTGGCGGTACATCATTCTGCTGGCAAAGCCCTCTCGTGGTCTGGGACCGCC  
ACCTGAGCATCTCGTGGCTGAAGCAGACATACCAAGGAGAAAGTGTGTGCCCTGTGGAAATTGGAT  
GGCATCCAGAACAAATGACCTCACCAGCAGCAACCTCCAAGTGGAGGAAGACCCCTGTGGACTTGGGAAACTC  
CTGGAAAGTGGAGCTCGCAGTGTGCTGACACCAGAAAAGTGCCTCTGGACTCATCCCTGCCACCTGCCATA  
ACAACATCATGAAGCAGACGATGGTGATTCTCTGTAGAATCCTTACCAAGTGAACGTCTCCAGGACTGC  
AACAGCTGGGGACCCCGAGCCATATCTGGATGTCATGCAATTAGACACCTGCTCTGTGAGTCCATTGG  
GGACTGCGCCTGCTTCTGCGACACCATTGCTGCCATGCCACCGTGTGCTGTGCCAGCATGCCAGGTGGTGA  
CCTGGAGGACGGCCACATTGTCGCCCTGGAGGCTGAGGAGAGGAATCTCCGGGAGAACGGGTATGAGTGT  
GAGTGGCGCTATAACAGCTGTGACCTGCCATGCCACTGCCCTCCAGGGAAAATCCTGGATGAGCTTGTGAGACCT  
TGTGAGCTGTGGAGGGCTGCCATGCCACTGCCCTGGAGGCTGAGGCCACTGCCCTGCC  
GCCCTGACCTGAAGACTGTCCAGTGTGAGGTTGGCTGGCCGGCTTTCCTCAGGAAAGAAAGTCACC  
TTGAATCCCAGTGAACCTGAGCACTGCCAGATTGCCACTGTGATGTTGTCACCTCACCTGTGAAGCCTG  
CCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGGCTCCCACAGATGCCCGGTGAGGCCACCACTCTGTATGTGGATG  
AGACGCTCCAGGATGGCTGTGATACTCACTCTGCAAGGTCAATGAGAGAGGAGAGTACTCTGGGAGAAG  
AGGGTCACAGGCTGCCACCCCTTGATGAACACAAGTGTCTGCTGAGGGAGGTTAAATATGAAAATTCC  
AGGCACCTGCTGTGACACATGTGAGGAGCCTGAGTGCAACGACATCACTGCCAGGCTGCAGTATGTCAAGG  
TGGGAAGCTGTAAGTCTGAAGTAGAGGTGGATATC
```

(в) Клонирование pSYN-ФВ-009, 010, 011, 012 и 013.

Конструкция pSYN ФВ-008 содержит последовательность полноразмерного ФВ в пЦДНК 3.1 (аминокислоты 1-2813 из SEQ ID NO: 2). Она содержит пропептид длиной в 763 аминокислоты (т.е. домены D1D2), за которым следует остальная последовательность из 2050 аминокислот зрелого ФВ. pSYN-ФВ-009, 010, 011 и 012 содержат одинаковые кодирующие последовательности, как и ФВ-001, 002, 003 и 004 соответственно, но дополнительно содержат домены D1D2 (пропептида ФВ) при N-конце вместо сигнального пептида Ф VIII. pSYN ФВ-008 содержит сайт BamH1 в Arg907 и сайт Not1 в конце кодирующей области (после стоп-кодона). pSYN-ФВ-008, 001, 002, 003 и 004 расщепляли рестрикционными ферментами BamH1 и Not1. Вставки из pSYN-ФВ-001 (423 п.н.о.), pSYN-ФВ-002 (1026 п.н.о.), pSYN-ФВ-003 (1128 п.н.о.) и pSYN-ФВ-004 (1743 п.н.о.) были лигированы в расщепленную BamH1/Not1 pSYN-ФВ-008 (8242 п.н.о.), чтобы получить pSYN-ФВ-009 (D1D2D'D3: аминокислоты 1-1039 из SEQ ID NO: 2); pSYN-ФВ-010 (D1D2D'D3: аминокислоты 1-1240 из SEQ ID NO: 2); pSYN-ФВ-011 (D1D2D'D3: аминокислоты 1-1274 из SEQ ID NO: 2); pSYN-ФВ-012 (D1D2D'D3: аминокислоты 1-1479). Все 4 конструкции содержат метку 6xHis при C-конце. В трансфицированных клетках pSYN-ФВ-009, 010, 011 и 012 синтезируются с пропептидом, но вследствие внутриклеточного процессинга секретируемые продукты не содержат пропептид (D1D2). Белок, экспрессируемый из конструкции ФВ-009, существует в виде мономера, а белки, экспрессируемые из конструкции ФВ-010, 011 и 012, как предполагается, существуют в виде димеров, как показано на фиг. 6 и 7, где в качестве примеров взяты соответственно ФВ-009 и ФВ-010.

pSYN-ФВ-010 использовали для получения pSYN-ФВ-013, которая содержит две точечные мутации в C336A и C379A, соответствующие SEQ ID NO: 73 (нумерация аминокислот представляет последовательность зрелого ФВ без ФВ последовательности 2 доменов D1D2). Эти мутации должны предотвращать димеризацию домена D'D3 ФВ.

(г) Клонирование pSYN-ФВ-025 и 029.

pSYN-ФВ-025 содержит D1D2D'D3 последовательности дикого типа полноразмерного ФВ в векторе pLIVE, в то время как pSYN-ФВ-029 содержит домены D1D2D'D3 с мутациями C336A/C379A в векторе pLIVE. Для клонирования pSYN-ФВ-025 и 029 использовали следующие комбинации праймеров:

ESC 89-прям. с сайтом Nhe1=CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCG(SEQIDNO: 66)

ESC 91-обратн. с Sal1=

CTGGATCCCAGGGAGTCGACTCGTCAGTGGTGTGGATGATG(SEQIDNO: 67)

Реакцию ПЦР проводили в 50 мкл с комбинациями праймеров ESC 89/ESC91 и плазмидами pSYN-ФВ-010 (для pSYN-ФВ-025) или pSYN-ФВ-013 (для pSYN-ФВ-029) в качестве матрицы, используя трехэтапный цикл ПЦР-амплификации: 94°C 2 мин; 21 цикл с (96°C 30 с, 55°C 30 с, 68°C 4 мин). Полосу с ожидаемым размером (~3800 п.н.о.) очищали гелем при помощи Gel Extraction kit (Киаген (Qiagen), Валенсия, Калиф.) и клонировали в рестрикционные сайты Nhe1 и Sal1 вектора pLIVE-Mirus (Инвитроген, Карлсбад, Калиф.) для получения pSYN-ФВ-025 и 029.

(д) Клонирование pSYN-ФВ-031.

pSYN-ФВ-031 является D1D2D'D3 (C336A/C379A)-Fc конструкцией, которая содержит тромбин-отщепляемый линкер длиной в 48 аминокислот (8× GGGGS (SEQ ID NO: 110) + тромбин-сайт) между последовательностями ФВ D1D2D'D3 (C336A/C379A) и Fc. Для создания этой конструкции область ФВ-Fc амплифицировали из конструкции pSYN-Ф VIII-064 (см. нижеприведенную конструкцию Ф VIII-ФВ). pSYN-Ф VIII-ФВ расщепляли Xba1 и Nhe1. Полученную область вставки в 4165 п.н.о., содержащую фрагмент ФВ и Fc-область, использовали в качестве матрицы для амплификации ФВ и Fc-области при помощи комбинаций праймеров LW 22/LW23.

LW 22-ПРЯМ.-ФВ-D'D3 с сигнальными последовательностями ФVIII и сайтом BsiW1

GCGCCGGCCGTACGATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTCTTCTGTGCCTTTGC

GATTCTGCTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG(SEQIDNO: 68)

LW 23-Обратн.- Fc со стоп-кодоном и сайтом Not1

TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATT CGCGGCCGCTCATT TACC(SEQIDNO:

Нуклеотидная последовательность ФВ 031 (SEQ ID NO: 108).

1	ATGATTCCCTGCCAGATTGCCGGGGTCTGCTTGCCTGCCCTCATTTC
51	GCCAGGGACCCCTTGTGCAGAAGGAACCTCGCGCAGGTATCCACGGCC
101	GATGCAGCCTTTCGGAAGTGACTTCGTCAACACCTTGATGGGAGCATG
151	TACAGCTTGCGGGATACTGCAGTTACCTCCTGGCAGGGGCTGCCAGAA
201	ACGCTCCTCTCGATTATTGGGACTTCAGAATGGCAAGAGAGTGAGCC
251	TCTCCGTGTATCTGGGAAATTGTTGACATCCATTGTTGTCATGGT
301	ACCGTGACACAGGGGGACAAAGAGTCTCCATGCCCTATGCCTCCAAAGG
351	GCTGTATCTAGAACTGAGGCTGGTACTACAAGCTGTCCGGTGAGGCCT
401	ATGGCTTGTGGCCAGGATCGATGGCAGCGGCAACTTCAAGTCCTGCTG
451	TCAGACAGATACTCAACAAAGACCTGCCGGCTGTGGCAACTTAAACAT
501	CTTTGCTGAAGATGACTTATGACCCAAGAAGGGACCTTGACCTCGGACC
551	CTTATGACTTGCACACTATGGGCTCTGAGCAGTGGAGAACAGTGGTGT
601	GAACGGGCATCTCCTCCAGCAGCTCATGCAACATCTCTGGGAAAT
651	GCAGAAGGGCCTGTGGGAGCAGTGCCAGCTCTGAAGAGCACCTCGGTGT
701	TTGCCCGCTGCCACCCCTGTGGTGGACCCCGAGCCTTTGCCCCCTGTGT
751	GAGAAGACTTTGTGTGAGTGTGCTGGGGGCTGGAGTGCGCCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAGTACGCCCGAACCTGTGCCCAGGAGGGAAATGGTGCTGTACG
851	GCTGGACCGACCACAGCGCGTGCAGCCCAGTGTGCCCTGCTGGTATGGAG
901	TATAGGCAGTGTGTGCCCCCTTGCGCCAGGACCTGCCAGAGCCTGCACAT
951	CAATGAAATGTGTCAAGGAGCGATGCCGTGGATGGCTGCAGCTGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCTGGATGAAGGCCTCTCGTGGAGAGCACCGAGTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCGAAAGCGCTACCCCTCCGGCACCTCCCTCTCGAGACTG
1101	CAACACCTGCATTGCCGAAACAGCCAGTGGATCTGCAGCAATGAAGAAAT
1151	GTCCAGGGAGTCCTGTCACTGGTCAATCCCACCTCAAGAGCTTTGAC
1201	AACAGATACTTCACCTTCAGTGGGATCTGCCAGTACCTGCTGGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGACCACCTCCATTGTCATTGAGACTGTCCAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGACGCTGTGCAACCGCTCCGTACCGTCCGGCTGCCCTGGC
1351	CTGCACACAGCCTGTGAAACTGAAGCATGGGCAGGAGTTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGACATCCAGCTCCCCCTCTGAAAGGTGACCTCCGCATCCAGC
1451	ATACAGTGACGGCTCCGTGCGCCTCAGCTACGGGAGGACCTGCAGATG
1501	GACTGGGATGGCCCGGGAGGCTGCTGGTGAAGCTGTCCCCGTCTATGC
1551	CGGGAAGACCTGCCCTGTGGGAATTACAATGGCAACCAGGGCGACG
1601	ACTTCCTTACCCCTCTGGGCTGGCGAGCCCGGGGTGGAGGACTTCGGG
1651	AACGCCTGGAAGCTGCACGGGACTGCCAGGACCTGCAGAACGACAG
1701	CGATCCCTGCGCCCTCAACCCCGCATGACCAGTTCTCGAGGAGGCCT
1751	GCGCGGTCTGACGTCCCCACATTGAGGCCTGCCATCGTCCGTCAAGC
1801	CCGCTGCCCTACCTGCGGAACCTGCCGCTACGACGTGTGCTCTGCTCGGA
1851	CGGCCGCGAGTGCCTGTGCGCGCCCTGGCAGCTATGCCGCGGCTGCG
1901	CGGGGAGAGGCCTGCGCGTGGCGCAGGCCAGGCCGCTGTGAGCTG
1951	AACTGCCCGAAAGGCCAGGTGTACCTGCAGTGCAGGGACCCCTGCAACCT
2001	GACCTGCCGCTCTCTTACCCGGATGAGGAATGCAATGAGGCCTGCC
2051	TGGAGGGCTGCTTCTGCCCTCAGGGCTCTACATGGATGAGAGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCAAGGCCAGTGCCCTGTTACTATGACGGTGAGATCTTCCA

2151 GCCAGAAGACATCTCTCAGACCATCACACCATGTGCTACTGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCACTGTACCATGAGTGGAGTCCCCGGAAGCTGCTGCCTGAC
 2251 GCTGTCCTCAGCAGTCCCTGTCATCGCAGCAAAGGAGCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCCATGGTCAAGCTGGTGTCCCCTGACAACCTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGAGTGACCAAAACGTGCCAGAACTATGACCTGGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCTGTGCTCTGGCTGCCTCTGCCCCCGGGCATGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGATGTGTGGCCCTGGAAAGGTGTCCCTGCTTCCATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGCCCTGGAGAAACAGTGAAGATTGGCTGCAACACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACCGGAAGTGGAACTGCACAGACCATGTGTGTGATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATCGGCATGGCCACTACCTCACCTCGACGGGCTAAATACC
 2651 TGTTCCCCGGGGAGTGCAGTACGTTCTGGTGCAGGATTACTGCGGCAGT
 2701 AACCTGGGACCTTCGGATCCTAGTGGGAATAAGGGATGCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAATGCAAGAAACGGGTACCATCCTGGTGGAGGGAGGAGA
 2801 TTGAGCTGTTGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCCATGAAGGATGAG
 2851 AACTCACTTGAGGTGGTGGAGTCTGGCCGGTACATCATTCTGCTGCTGGG
 2901 CAAAGCCTCTCCGTGGTCTGGACCGCCACCTGAGCATTCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGACATACCAGGAGAAAGTGTGTGGCCTGTGTGGGAATTGAT
 3001 GGCATCCAGAACAAATGACCTCACCAGCAGCAACCTCAAGTGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGACTTGGAAACTCCTGGAAAGTGGAGTGCAGTGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGTGCCTCTGGACTCATCCCTGCCACCTGCCATAACAAACATC
 3151 ATGAAGCAGACGATGGTGGATTCTCCTGTAGAATCCTTACCAAGTGCAGT
 3201 CTTCCAGGACTGCAACAAGCTGGTGACCCCGAGCCATATCTGGATGTCT
 3251 GCATTACGACACCTGCTCCTGTGAGTCATTGGGACTGCGCCGCATT
 3301 TGCGACACCATTGCTGCCTATGCCACGTGTGTGCCAGCATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGGAGGACGGCCACATTGTGCCAGAGCTGCGAGGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGAGAACGGGTATGAGGCTGAGTGGCCTATAACAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCTGTCAAGTCACGTGTCAAGCACCCTGAGCCACTGGCCTGCC
 3501 GCAGTGTGTGGAGGGCTGCCATGCCACTGCCCTCAGGGAAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTGCAAGACCTCGCTTGACCTGAAGACTGTCCAGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCCGGCTTTGCCTCAGGAAAGAAAGTCACCTTGAATCCCAG
 3651 TGACCCCTGAGCACTGCCAGATTGTGCACTGTGATGTTGTCACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTGCCAGGAGCCGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGG
 3751 GGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATC
 3801 CGGTGGCGGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGCAGCGCGGTGGAGGTTCCG
 3851 GTGGCGGGGGATCCGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCTCCA
 3901 GAACTCCTGGCGGACCGTCAGTCTCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGA
 3951 CACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCGTGGTGGACG
 4001 TGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
 4051 GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 4101 GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
 4151 GCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC
 4201 GAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTA
 4251 CACCCCTGCCCTATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGAGCCTGA
 4301 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAG
 4351 AGCAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAACGCCCTCCGTGG
 4401 CTCCGACGGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
 4451 GGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 4501 CACAACCACTACACGCAGAACAGGCCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

Белковая последовательность ФВ-031 (SEQ ID NO: 109).

1	MI PARFAGVLALALILPGLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSM
51	YSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNG
101	TVTQGDQRVSMPYASKGLYLETAEAGYYKLSGEAYGFVARIDSGNFQVLL
151	SDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTILTSDPYDFANSWALSSGEQWC
201	ERASPPSSSCNISSGEMQKGLWEQCOLLKSTSVDPLVPEPFVALC
251	EKTLCECAGGLECACPALEYARTCAQEGMVLYGWTDHSSACSPVCPAGME
301	YRQCVSPCARTCQLSLHINEMCQERCVDGCSCPEQQLLDEGLCVESTECPC
351	VHSGKRVPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFD
401	NRYFTFSGICQYLLARDQDHFSIIVETVQCADDRAVCTRSVTVRP LPG
451	LHNSLVKLKHAGVAMDQDIDQLPLLKGDLRQHTVTASVRLSYGEDLQM
501	DWDGRGRLLVQLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLAEPRV EDFG
551	NAWKLHGDCQDLQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVS

```

601 PLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGRVVAWREPGRCEL
651 NCPKGQVYLQCGTPCNLTCSRSLSYPPDECNEACLEGCFCPGILYMDERGD
701 CVPKAQCPYYDGETFQPEDI FSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLCTKTCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLCPGPMVRHENRCVALERCPFHQGKEYAPGETVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTTFDGLKYLFPGECQVVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVGNKCCSHPSVKKKRVTILVEGGEIELFDGEVNVRPMKDE
951 THFEVVESEGRYIILLLGKALSVVWDRHLSISVVLQTYQEKGCLCGNFD
1001 G1QNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSCRILTSDFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCAAF
1101 CDTIAAXAHVCAQHGVVTWRATLCPPOSCEERNLRENGYEAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGKKVTLNPSDPEHQC1CHCDVNVNLTCEACQEPISGGGGSGGG
1251 GSGGGGGGGGGGGGGGGGGSLVPRGSGGGGGGSDKTHTCPAP
1301 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKNWYVDGV
1351 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
1401 EKTISAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
1451 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEAL
1501 HNHYTQKSLSLSPGK*

```

Конструкция ДНК	Линкер между ФВ Fc
ФВ035	73 ак= IS{11X(GGGGS)}LVPRGSGGGGGGGG (SEQ ID NO: 96)
ФВ036	98 ак= IS{16X(GGGGS)}LVPRGSGGGGGGGG (SEQ ID NO: 97)
ФВ= D'D3 (ак 1-477 с C336A/C379A)	

Продукт ПЦР, полученный амплификацией LW22/LW23 (~2300 п.н.о.) клонировали в расщепляемую BsiW1/Not1 pSYN-ФВ-002 для получения промежуточного продукта pSYN-ФВ-014. pSYN-ФВ-014 содержит 20-аминокислотный тромбин-отщепляемый линкер между сигнальным пептидом Ф VIII и D'D3, за которым следует Fc-область.

Для создания конструкции D1D2D'D3-Fc область D1D2D'D3 амплифицировали обычным ПЦР-методом из pSYN-ФВ-013, используя комбинацию праймеров LW24/LW27.

LW24- Прям.-ФВ D1D2D'D3 клонирующий олиго с сайтом BsiW1

GCGCCGGCCGTACGATGATTCCCTGCCAGATTGCCGGGGTG(SEQIDNO: 70)

LW27-Обратн.-ФВ D'D3 олиго с EcoRV

CCACCGCCAGATATCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAG (SEQ ID NO:71)

Продукт ПЦР, полученный амплификацией LW22/LW23 (~3750 п.н.о.) клонировали в расщепляемую BsiW1/EcoRV pSYN-ФВ-014 для получения промежуточного продукта pSYN-ФВ-015. Длина линкера между фрагментом ФВ и Fc-областью изменили, чтобы получить pSYN-ФВ-031.

Белковая последовательность полноразмерного ФВ приведена в табл. 1.

Белковая последовательность ФВ-Д1Д2Д'Д3 16 (SEQ ID NO: 72).

```

1      MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSM
51     YSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNG
101    TVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARI DSGGNFQVLL
151    SDRFNKTGGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWC
201    ERASPSSCNSSGEMQKGLWEQCLLKS TSFVARCHPLVDP EPEPVALC
251    EKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVL YGWTDHSACSPVC PAGME
301    YRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLC VESTECPC
351    VHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSF D
401    NRYFTFSGICQYLLARDCDHSFSIVIETVQCADRDAVCTRSVTVRLPG
451    LHNSLVKLKHAGVAMDQD IQLP LKGDLRIQHTVTASVRLS YGEDLQM
501    DWDGRGRLLVVKLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLA EPRVEDFG
551    NAWKLHGDCQDLQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVS
601    PLPYLRCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCEL
651    NCPKGQVYLQCGTPCNLTCSRSLSPD EECNEACLEGFCPPGLYMD ERGD
701    CVPKAQCPCYDGEIFQPEDIFS DHDHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPD
751    AVLSSPLSHRSKRSLS CRPPMVKLVC PADNLAEGLE CTKTCQNYDLECM
801    SMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCHQGKEYAPGETVKIGCNC TV
851    CRDRKWNCTDHVC DATCSTIGMAHYLT FDGLKYLFPGE CQYVLVQDYCGS
901    NPGTFRI L VGNKGCSHPSVKCKRVTI LVEGGEI ELDGEV NVKRP MKDE
951    THFEV VESGRYI I LLLGKAL SVVWDRHLSI SVV LKQTYQEKVCGLCGNFD
1001   GIQNNDLTSSN LQVEEDPVDFGNSWKVSSQ CADTRKVP LDSSP ATCHNN I
1051   MKQTMVDSSCRIL TSDV FQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCS CESIGDCACF
1101   CDTIAAYAHVCAQHGKVVTWRTATLC PQSCEERNLRENGYECEWRYNSCA
1151   PACQVTCQHPEPLACPVQC VEGCHAHC PPGK I LDELLQTCVDPEDCPVCE
1201   VAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQI CHCDVVNL TCEACQEP*

```

Белковая последовательность ФВ-Д'Д3 2 (SEQ ID NO: 73).

```

1      SLSCRPPMVKLVC PADNLAEGLE CTKTCQNYDLE CMSMGCVSGCLC PPG
51     MVRHENRCVALERCPCHQGKEYAPGETVKIGCNC TVCRDRKWNCTDHVC
101    DATCSTIGMAHYLT FDGLKYLFPGE CQYVLVQDYCGS NPGTFRIL VGNKG
151    CSHPSVKCKRVTI LVEGGEI ELDGEV NVKRP MKDE THFEV VESGRYI I
201    LLLGKAL SVVWDRHLSI SVV LKQTYQEKVCGLCGNFD GIQNNDLTSSN LQ
251    VEEDPVDFGNSWKVSSQ CADTRKVP LDSSP ATCHNN IMKQTMVDSSCRIL
301    TSDV FQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCS CESIGDCACFC DTIAAYAHVCAQ
351    HGKVVTWRTATLC PQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPL
401    AC PVQC VEGCHAHC PPGK I LDELLQTCVDPEDCPVCEA GRRFASGKKV T
451    LNPSDPEHCQI CHCDVVNL TCEACQEP*

```

Пример 2. Гетеродимерные конструкции, содержащие Ф VIII-Fc и ФВ-Д'Д3 домен при аминоконце второй цепи Fc (гетеродимер Ф VIII-ФВ-Fc, фиг. 2).

(а) Клонирование pSYN-Ф VIII-064.

Плазмида Ф VIII-064 содержит одноцепочечный остов FC (scFc) с сайтами расщепления ферментами, которые процессируются во время синтеза в клетке. Конструкция содержит Ф VIII-связывающий домен полноразмерного ФВ (D'D3).

Плазмида (pSYN-Ф VIII-064) была сконструирована для экспрессии гетеродимера Ф VIII-Fc и ФВ-Fc, в котором домены D'D3 предназначены для связывания Ф VIII и предотвращения взаимодействия Ф VIII с фосфолипидами и активированным протеином С или предотвращения или подавления связывания с эндогенным ФВ. Белок из pSYN-Ф VIII-064 экспрессируется в клетке в виде одиночного полипептида, где С-конец субъединицы Ф VIII-Fc связан с N-концом субъединицы ФВ D'D3-Fc посредством полипептидного линкера 6x (GGGGS) (SEQ ID NO: 74). Дополнительно в 5' и 3' концы полипептидного линкера были вставлены последовательности RRRRS (SEQ ID NO: 75) и RKRRKR (SEQ ID NO: 76), соответственно, для внутриклеточного расщепления пропротеинконвертазами сразу после последнего Arg в каждой последовательности. Следовательно, клетки могут экспрессировать двухцепочечный гетеродимер Ф VIII-Fc/D'D3-Fc, в котором цепь Ф VIII-Fc содержит последовательность RRRRS (SEQ ID NO: 75) в С-конце, но при этом остаток последовательности линкера удален. Другой полипептидный линкер 3x (GGGGS) (SEQ ID NO: 28) вместе с сайтом расщепления тромбином вставляли между доменами ФВ и Fc-областью для того, чтобы способствовать отделению фрагмента ФВ от Ф VIII в случае активации гетеродимерного белка Ф VIII-ФВ тромбином, которая делает возможным взаимодействие Ф VIII с другими факторами свертывания крови.

Проводили синтез фрагментов ДНК, содержащих часть первой Fc-области, за которой следует 6x (GGGGS) (SEQ ID NO: 74), домен ФВ-Д'Д3 domain (ак 1-477; мутация C336A/C379A), 3x (GGGGS) (SEQ ID NO: 28), сайт расщепления тромбином и часть второй Fc-области (Genscript - номер последовательности 103069, показана ниже). Фрагмент конструкции Genscript субклонировали в расщепляемую Sall/RsRII pSYN-Ф VIII-049, которая является конструкцией Ф VIII-Fc с отщепляемым линкером между двумя Fc-доменами. Genscript - номер последовательности 103069 (SEQ ID NO: 82):

CCGTCGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAAC
 CACTACACCGAGAACGCCCTCTCCCTGTCCTCCGGTAAACGGCCGCCGGAGCGGTGGCGGCGATCAGG
 TGGGGGTGGATCAGGCCGTGGAGGTCGGGTGGCGGGGATCCGGGTGGAGGTTCCGGTGGGGTGGAT
 CAAGGAAGAGGAGGAAGAGAAGGCCTACCTGTCGCCGGCCCGATGGTCAAGCTGGTGTGTCCTGACAAC
 CTGCGGGCTGAAGGGCTGAGTGTACAAAACGTCCAGAACTATGACCTGGAGTGCATGAGCATGGCTG
 TGTCTCTGCTGCTGCCCTGCCCGGCGATGGTCCGGCATGAGAATCGATGTTGCCCTGGAAGGGTGTG
 CCTGCTTCCATCAGGGCAAGGGAGTGGGGAGAAACAGTGAGAAGATTGGCTGCAACACTTGTGCTG
 CGGGACGGGAAGTGGAAACTGCACAGGACATGGTGTGATGCCACGTGTCACGATGGCATGGCCACTA
 CCTCACCTTCGACGGGCTCAAATACCTTCCCGGGAGTGCAGTACGTTCTGTCAGGATTACTGCG
 GCAGTAACCCCTGGGACCTTCGGATCCTAGTGGGAAATAAGGGATGCAGCCACCCCTCAGTGAAATGCAAG
 AAACGGGTACCATCCTGGTGGAGGGAGGAGAGATTGAGCTTTGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCC
 CATGAAGGATGAGACTCACTTGAGGTGGAGTCTGGCGGTACATCATTCTGCTGCTGGGAAAGGCC
 TCTCCGTTGCTGGGACCGCCACCTGAGCATCTCGTGTGGCTCTGAAAGCAGACATACCCAGGAGAAAGTGTG
 GGCCTGTTGGAAATTGTGATGGCATCCAGAAACAATGACCTCAGCAGCAACTTCAAGTGGAGGAAGA
 CCCTGTGACTTTGGGAAACTCCTGGAAAGTGAAGCTCCAGTGTCGTGACACAGAAAAGTGCCTTGGACT
 CATCCCCCTGCCACCTGCCATAACACATCATGAAGCAGACGATGGTGGATTCTCTGTAGAATCCTTAC
 AGTGACGTCTCCAGGACTGCAACAAGCTGGTGGACCCGAGCCATATCTGGATGTCATGCATTACGACAC
 CTGCTCTGTGAGTCATTGGGACTGCCCGCATCTGCGACACCATTGTCGTCTATGCCACCTGTTG
 CCCAGCATGGCAAGGGTGTGACCTGGAGGACGGCACATTGTGGCCCGAGAGCTGCGAGGGAGGAATCTC
 CGGGAGAAGGGTATGAGGCTGAGTGGCCTATAACAGCTGTGCACTTGCCTGTCAAGTCACGTGTCAGCA
 CCCTGAGCCACTGGCTTGTGCACTGTGTGGAGGGCTGCCATGCCACTGCCCTCCAGGGAAAATCC
 TGGATGAGCTTTGCACTGCACTGTCAGCTGAACACTGTCCTGAGGCTGACACTGCCAGATTGCACTGTGATGTTG
 GCCTCAGGAAAGAAAGTCACCTGAATCCCAGTGACCTGGCAGACTGCCAGATTGCACTGTGATGTTG
 CAACCTCACCTGTGAAGCCTGCCAGGAGCGATCGATGGCGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCCTGG
 TCCCCCGGGGAGCGAGCAAAACTCACATGCCACCCAGCTCCAGAACTCCTGGCGGA
 CCGTCA

(б) Клонирование pSYN-Ф VIII-065.

Плазмида Ф VIII-065 содержит первые 276 аминокислот домена D'D3 ФВ, присоединенные ко второй Fc-области. Фрагмент ФВ амплифицировали при помощи ПЦР из полноразмерной плазмида pSYN-ФВ-008, используя комбинации праймеров ESC17 и ESC41.

ESC17-Прям.- ФВ клонирующий олиго с Cla1

GTCCGGCATGAGAATCGATGTGTG(SEQ ID NO: 77)

ESC41- Обратн.-ФВ с EcoRV

CCTCCACCGCCAGATATCAGAGGCACTTTC (SEQ ID NO: 78)

Полосу с ожидаемым размером (~692 п.н.о.) очищали гелем при помощи Gel Extraction kit (Киаген (Qiagen), Валенсия, Калиф.) и клонировали в сайты Cla1 и EcoRV pSYN-Ф VIII-064 для получения pSYN-Ф VIII-065.

Пример 3. Клонирование pSYN-Ф VIII-159, 160, 178, 179 (фиг. 3).

С целью изменения длины линкера между фрагментом ФВ и Fc-областью в месте соединения ФВ и начала 20-аминокислотного линкера в pSYN-Ф VIII-064 вставляли сайт EcoRV, затем линкеры переменной длины использовали для замещения 20-ак линкера в pSYN-Ф VIII-064. Новыми конструкциями ДНК являются: pSYN-Ф VIII-159, 160, 178 и 179, которые содержат 35-ак, 48-ак, 73-ак и 98-ак линкеры соответственно.

Для того чтобы вставить 35-аминокислотный линкер в pSYN-Ф VIII-159, были заказаны два олиго (ESC78 - 105 п.н.о. и ESC79 - 107 п.н.о.) от Integrated DNA Technologies, Inc (Коралвилль, Айова). Олиго ренатурировали и продлевали при помощи стандартного метода ПЦР.

Праймеры:

ESC78- Прям. с сайтом EcoRV

AAAGTGCCTGTGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGGATCCGGTGGCGGG
 GGATCCGGTGGCGGGGGATCCGGTGGCGGGGGATCCCTGGTCCCCCGG (SEQ ID

NO: 79)

ESC79- Обратн. с сайтом RsRII

GAAGAGGAAGACTGACGGTCCGCCAGGAGTTCTGGAGCTGGCAGGGTGGCATGT

GTGAGTTTGTGCGCTCCGCTGCCCGGGGACCAGGGATCCCCGCCAC (SEQ ID

NO: 80)

Реакцию ПЦР по ренатурированию и продлению олиго проводили в 50 мкл с комбинациями праймеров ESC78/ESC79, используя трехэтапный цикл ПЦР-амплификации: 25 циклов с (96°C 30 с, 55°C 30 с, 68°C 30 с). Полосу с ожидаемым размером (~186 п.н.о.) очищали гелем при помощи Gel Extraction kit (Киаген (Qiagen), Валенсия, Калиф.) и клонировали в рестрикционные сайты EcoRV и RsRII pSYN-Ф VIII-064 для получения pSYN-Ф VIII-159.

(б) Клонирование pSYN-Ф VIII-160, 178 и 179.

pSYN-VIII-160 содержит 48-аминокислотный линкер между фрагментом ФВ и Fc-областью. Проводили синтез фрагмента ДНК, кодирующего 48-аминокислотный линкер

(ISGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLVPRGSGGGSGGGS)

SEO ID NO: 81) и

часть Fc-области (Genscript - последовательность номер 132601, показана ниже). Фрагмент конструкции Genscript субклонировали в расщепляемую EcoRV/RsRRII pSYN-Ф VIII-0159 (упомянуто выше). Genscript - последовательность номер 132601 (SEQ ID NO: 83)

AAAGTGCCTCTGATATCTGGCGGTGGAGGGTCCGGTGGCGGGGGATCCGGCGGTGGAGGGTCCGGCGGTGG
AGGTTCCGGTGGCGGGGGATCCGGTGGCGGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGGAGCGGGCGGTGGAGGGTCCG
GTGGCGGGGGATCCGACAAAACATCACACATGCCAACCGTGCCAGCTCCAGAACTCCTGGCGGACCGTCA
GTCTTCC

SYN-VIII-178 содержит 73-аминокислотный линкер между фрагментом ФВ и Fc-областью. Проводили синтез фрагмента ДНК, кодирующего 73-аминокислотный линкер

Изображение фрагмента ДНК, кодирующей аминокислотный линкер
**(ISGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVP
RGSGGGGSGGGS)**

(SEO ID NO: 84)

и часть Fc-области (Genscript - последовательность номер 144849, показано ниже). Фрагмент конструкции Genscript субклинико-рекомбинантную EcoRV/RsRRI pSYN-Ф VIII-0159 (упомянуто выше). Genscript - последовательность номер 144849 (SEQ ID NO: 85)

SYN-VIII-179 содержит 98-аминокислотный линкер между фрагментом ФВ и Fc-областью. Проводили синтез фрагмента ДНК, кодирующего 98-аминокислотный линкер

SEQ ID NO: 86 11

часть Fc-области (Genscript - последовательность номер 144849, показано ниже). Фрагмент конструкции Genscript склонирован в расщепляемую EcoRV/RsRV pSYN-Ф VIII-0159 (упомянуто выше).

Сенскрипт - последовательность номер 144849 (SEO ID №: 87)

скрипт - послідовність №мер 144847 (SEQ ID NO. 87)
GCCTGCCAGGAGCCGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGCGG
TGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCG
GCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTT
TCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGCAGCGGGCG
TGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGACAAACTCACACATGCCAACGTGCCAGCTCCAGAACTCCTGG
GCGGACCGTCAGTCTCTCTTCCC

Клонирование pSYN-Ф VIII-180, 181 и 182.

pSYN-Ф VIII-180, 181 и 182 получали из pSYN-Ф VIII-160. В pSYN-Ф VIII-160FVIII в домен C1 Ф VIII вносили мутации K2093A или F2093A или K2093A/F2093A для создания соответственно pSYN-Ф VIII-180, pSYN-Ф VIII-181 и pSYN-Ф VIII-182.

Белковая последовательность гетеродимера Ф VIII-ФВ-Fc (SEQ ID NO: 88) (аминокислотные позиции 1-1457 последовательности Ф VIII; область, выделенная подчеркиванием, представляет Fc-область; выделение подчеркиванием волнистой линией представляет отщепляемый линкер между первой Fc-областью и фрагментом ФВ; выделенная двойным подчеркиванием область представляет фрагмент ФВ; выделенная жирным шрифтом область представляет отщепляемый линкер переменной длины между фрагментом ФВ и Fc. Длина линкера отличается для конструкций Ф VIII-064, 159, 160, 178 и 179).

```

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQS DL GELPVNDARFP
51 PRVPKSFPN TSVVYKKTLF VEFTDHLFNI AKPRPFWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRN LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLI DLGQFLLFCR ISSHQHDGME AYVKVDSCE
351 EPQLRMKNN EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKPKT
401 WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILP LLYGEVGDYL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMR DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLP PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNNG MTALLKVSSC DKNTGDDYYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPBVLRK HQREITRTTL QSDQEIDYD DTISVEMKKE
801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
901 RNQASRPFY YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHHMAP
951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1001 FALFFTI FDE TKSWYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1051 MDTLPGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKML
1101 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1151 GMASGHIRDF QITASGQYQGQ WAPKLARLHY SGSIINAWSTK EPFSWIKVDL
1201 LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1251 FFGNVDSSGI KHNI FNPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNCS
1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS QDGHQWTLFF
1401 QNGKVKVFOG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWSH QIALRMEVLG
1451 CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCV
1501 DVSHEDPEV KFNWYVVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPOVYTLPP SRDELTKNQV
1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKRRRRSG GGGSGGGGSG
1701 GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG RKKRKRSLSCR PPMVKLVCPA DNLRAEGLC
1751 TKTCONYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP CFHOGKEYAP
1801 GETVKIGCCT CVCRDRKWNC TDHVCDATCS TIGMAHYLTG DGLKYLFPGE
1851 CQYVLVQDYC GSNPGTFRIL VGNKGCSHPS VKCKKRVTIL VEGGEIELFD
1901 GEVNVKRPMK DETHFEVVES GRYI TILLGK ALSVVWDRHL SISVVLQTY
1951 QEKVCGLCGN FDGIONNDLT SSNLQVEEDP VDFGNNSWKVS SOCADTRKVP
2001 LDSSPATCNS NIMKQTMVDS SCRILTSDFV QDCNKLVDPE PYLDVCIYDT
2051 CSCESIGDCA AFCDTIAAYA HVCQAHGKVV TWRTATLCPQ SCEERNLREN
2101 GYEAEWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVQ CVEGCHAHCP PGKILDELO
2151 TCVDPEDCPV CEVAGRRFAS GKKVTLNPSD PEHCQIICHCD VVNLTCEACO
2201 EPIDGGGGSG GGGSLVPRGS GGDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
2251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
2301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREEQYNS
2351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVLL
2401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

Пример 4. Пример ДНК-конструкций Ф VIII-ФВ (фиг. 4).

Фрагмент ФВ и белок Ф VIII могут быть связаны вместе посредством линкера, или другого белка, или полипептида при помощи общепринятых рекомбинантных ДНК-технологий, как показано на фиг. 4. На фиг. 4А домен D1D2D'D3 ФВ связан с белком Ф VIII посредством 48-ак линкера

ISGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVPRGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 89) и защищает Ф VIII от преждевременного выведения. Для того чтобы дополнительно увеличить Ф VIII-защитную активность D'D3 в конструкцию можно включить другой белок или полипептид, который обладает свойством продления времени полужизни, такой как альбумин или последовательность PAS (гетерологичные компоненты). Гетерологичный компонент, например белок альбумина или последовательность PAS, можно вносить в различные позиции молекулы Ф VIII; несколько примеров показано на фиг. 4Б-4Г: в N-конце Ф VIII (4Б), в C-конце Ф VIII (4В) или в B-области (4Г). В этих конструкциях дополнительные белковые последовательности могут увеличить защитную активность D'D3 и дополнительно продлить время полужизни Ф VIII.

В добавок, гетерологичный компонент, например альбумин или последовательность PAS, также можно вносить в гетеродимерные конструкции Ф VIII/ФВ, как показано на фиг. 4Д-4Ж. На фиг. 4Д гетерологичный компонент, например альбумин или последовательность PAS, внесен в B-доменную область Ф VIII, белка Ф VIII-148; на фиг. 4Е гетерологичный компонент, например альбумин или последовательность PAS, внесен в B-доменную область Ф VIII, белка Ф VIII-136; на фиг. 4Ж гетерологичный компо-

ент, например альбумин или последовательность PAS, используется в качестве линкера для соединения фрагмента D'D3 и Fc. Ожидается, что в этих конфигурациях общий эффект от D'D3, Fc и гетерологичного компонента, который является продлевающим время полужизни веществом (например, альбумин/последовательность PAS), отразится на продлении времени полужизни Ф VIII.

Пример 5. Плазмидное конструирование системы котрансфекции для гетеродимера Ф VIIIIFc-ФВ (фиг. 5).

Для получения гетеродимера Ф VIIIIFc-ФВ создавали систему котрансфекции, которая содержит три конструкции ДНК. Первая конструкция ДНК - pSYN-Ф VIII-155 - кодирует слитый белок Ф VIII-Fc, в котором одноцепочный белок Ф VIII напрямую сшит с одиночным фрагментом Fc, а второй конструкцией ДНК является pSYN-ФВ-031, которая кодирует слитый белок D'D3-Fc (упомянутый выше в примере 1). Клетки HEK293F трансфицировали двумя плазмидами совместно с третьей плазмидой (PC5) в соотношении 80:15:5. Котрансфекцию PC5 проводили для того, чтобы точно обеспечить полный пропептидный процессинг областей D1 и D2, чтобы в итоге получить зрелые домены D'D3. Синтезированные белки секретировались в виде гетеродимера Ф VIIIIFc/D'D3Fc и гомодимера D'D3Fc, после чего гетеродимер Ф VIIIIFc/D'D3Fc отделяли от гомодимера D'D3Fc при помощи очистки белка.

Последовательность зрелого белка pSYN-Ф VIII-155 (SEQ ID NO: 90):

ATRRYYLGAEVLSWDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFPFNTSVYVKKTLFVFTDHLFNIAKPRPPWMLG
LGPTIQAEVYDVTWVITLKNMASHPVSPLSHVAGVSYWSKASEGAYDQDTSQREKEDVKKFPGGSHTYVWQLVK
ENGPMSADPLCLTYSVLSHFLVVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTLHFKLFLLAFFGDSKWHSETK
NSLMDQRDAASARAWPKMHTVGYVNRNSLRLGIGLCHRKSVWYHMGTTPEVHSIFLEGHFTFLVRNHRQA
SLEISIPITFLTAQTLMDLGQFLLFCIHSSHHQDGMEMAYVVKDSCPEEPQLRMRKNNNEAEDYDDDLTDSEM
DVRVFRDDNSPSFIQIRSVSKAHHPKTWVYIUAEEEDWDYPAVLVPLAPDDRSYQSQYLNNGPQTGRKYR
FRMFAYDTEFKTRAEIQHESGLPGLYGEVGDFTLIIIFKFNQASRPYNTVYHPTDVRVPLYSRRLPKGVKH
LKDFFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPFCCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDRQRNQIIMS
KRDNVILFWSVDENRWSYLTERNIQFRLPNPAGVQLEDEFPEQASINMHSINGYVFDLSLQSVLCHAVEWYV
LSIGAQTDLFSWVFGSYFQKHMVYEDTLLTFPSGETVFMSENPGWLIGCHNSDFRNRTMALLKVVY
CDKNTGDDYEDSYEDISAYLLSKNNAEIPRSFSQNPPVLAHKQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKE
DDFIYDEDENQSRSFSQKTKTRHYFIAAVERLWYDGMSSPHVFLRNRAQSMSGVQPKVVFQEFDTGDSFTQP
LYRGRENELHGLLGPYIIRAEVENDIMVTFRNQASRPYFSSYLIQSEEDRQGAEPFRNPKVFMKETTY
VQHNNHMAPTKDEFDCKAWAYFSVDLVEKDUDHSVHSLIGLIPFLVCHNTLNPAHQGRVTFVQEAFLLFTI
WYFTENMERNRNCRAPCNIQMDPTFKENYRFAHNGYIMDTLGLVMAQDQRIRWYLLSMSGSNCENIHSIH
GHVFTVRKKEEYMAKALNLYLPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTFLVYSNKNCOPPLGMS
HFRDFTIAGSQYQWAPKLARLHYGSINAWSTKEFPSWIKVLDLAPPIIHGKLTQGARQFSSLLYISOF
IIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLVFFGNVDDSGIKHNIFNPPIIARYIIRLHPHTHSIRSTLRFMELMGCDLN
SPCSLGMGMSKAISDAQITTASSYNTMMATFWSPLSKARLHQGRNSARAWPQVNONKWEILQVDFQKTMKV
TTQGVKSLLTISMYKVEFLISSSSQDGHQWTLFQNGVKWVFCQNGQDSFTPVVNSLDLPPLLTRYLRIQPSW
HQIALPMEVLGCEAQDLYDQDKTHCCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDFTLMSITPEVTCVVVDVSHEDPEV
FKNWFYVGDVEVHNNAKTKPREGCNYSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPR
EPQVQYTLPPSFTKQNVSLTCLVKGYFSPDIAVEWESNGQPNENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
RWWQONGVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPFGK

Последовательность ДНК pSYN-Φ VIII-155 DNA (SEQ ID NO: 91):

ATGCAATAGAGCTTCACCTGCTTCTCTGTGCCATTGGCATTCGCTTAGTGCACAGAGATA
CTACCTGGGTGCACTGGAACTCTCATGGGACTATATGCAAAAGTATCTCGGTGAGCTGCCCTGGACGCCAA
GATTCTCTCTAGGGTGCACCATCTTCCATACACCTCAGTGTGTCAGGAAAGACTCTGTTGTA
GAATTCCAGGTACCTTTCAACATCGTAAGGCCAACCTGGTGTGGTCTGCTAGTCCACCAT
CCAGGCTGAGGTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAAGAACATGGCTTCCATCTGTCACTTCTGATG
CTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTCTGAGGGAGCTGAATATGATGTCAGACAGTCAAAGGGAGAAA
GAAGATGATAAAGTCTCCCTGGTGAACCATACATATGTCGCGAGTCTGAAAGAGAATGGTCCAT
GGCTCTGACCCACTGTGCTTCACTACTCATATCTTCTCATGTGCACTGGTAAAGAGCTTGTG
GCCCTATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGCCAAGGAAAGACACAGCTTGACAAA
TTTACTACTTTTGTGTTATGTAGGAGGAAAGTGGCCTACTCAGAAAACAAAAGACTCTGATGCA
GGATAGGATGTCGTCATCTGTCGGCCCTGCCTTAAATGCAACAGTCAGTGTATGTAACAGTCTC
TGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGATGGCACCACTCTGAA
GTGCACTAAATTCCTGCAAGTCACACATTCTTGAGGAACCATGCCAGGCTCTGGAAATCTC
GCCCAACTTCTTCACTGTCAACACCTCTGATGGACCTTGTGACAGTTCTACTGTTTGTATCAT
CTTCCCAACAACTGATGGCATGGAGCTTATGTCAAGTAGACAGCTGTGCAAGGAAACCCAACACTGAA
ATGAAAATAATGAAGAAGGCCAGAAGCTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTCAGGTT
TGATGATGCAACTCTCTCTTCTTATGCCAAATTGCTCACTGGCAAGACATCTAAACTTGGTAC
ATTACATTGCTGTAAGAGGGAGACTGGGACTATGCTCCCTATGCTCGCCCTGGAGACAGT
AAAAGTCATAATTGGACAATGGCCCTCAGCGGATTGTAGGAGACTACAAAAAAAGTCGATTATGCCATA
CACAGATGAAACCTTAAAGACTCGTGAAGCTTACCGATGAATCAGGAATCTGGACCTTACTTGTG
GGGAATGGAGACACACTGTGATTATTAAGAATCAAGCAAGCAGACCCATAACATCTACCCCTCAC
GGAATCACTGATGTCGCCCTTGTATTCAAGGAGATAACAAAAGTGTAAAACATTGAAAGGATTTC
AATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAAATATAATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGCAACTAAATCAGTC
CTCGTGTGCGTGCACCCGTTACTACTGTGTTCTGTTAATGGAGAGACTGACCTCAGGACTATTGCC
CCTCTCTCATCTGCAACAAAGATCTGATGACCAAGGAAACAGGATAATGTCAGAACAGGAAATG
CATCTGTTTGTATTGTGAGAACCGAACGCTGGTACCTCAGAGAATAATCACACGCTTCTCCCA
ATCCAGCTGGAGTGCACTTGAGGATCCAGAGTCTCAAGGCCAACATCATGACAGCATCAATGGCTAT
GTTTGTGATGTTGCACTGGTCTGACTGTTCTGATGAGGTGCTCATCTGACATTGAGAC
ACAGACTGACTCTCTTCTGTTCTCTGTTGAGGATACATGGTACATTCAAGCATGGAC
TCACCCATTCTCCCATCTCAGGAGAAACTGCTTCTGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGG
TGCCACAACACTGACACTTGGCAACAGGACATGACCCCTTACTGAAGGTTTCTAGTGTGACAAGAAC
TGGTGAATTATGAGGACAGTGTGAGGATATTCTGACATCTGTCAGGAAATAACACTGCTACTCTCAG
CAAGAGCTCTCTCAACACCCAGTGTGAAAGGCCATCGGGGAAATAACTGCTACTCTCAG

TCAGATCAAGAGGAATTGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGTTTGACATTAA
 TGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCGAGCTTCAAAAGAAAACGACACTATTCTGTCAGTG
 AGAGGCTCTGGATTATGGATGAGTACCTCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTG
 CCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTCCAGGAATTACTGATGGCTCCTTACTCAGGCCCTTATACCGTGGAGA
 ACTAAATGAACATTGGACTCTGGGCATATAAGAGCAAGAGTGAAGATAATCATGTAACCT
 TCAGAAATCAGGCCCTCGTCCCTATTCTCTATTCTAGCCTTATTCTATGAGGAAGATCAGAGGCAA
 GGAGCAGAACCTAGAAAACCTTGTCAAGGCTAATGAAACCAACTTGTGGAAAGTCAACATCA
 TATGGCACCCACTAAAGATGAGTTGACTGAAACCTGGCTTATTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAG
 ATGTCACCTAGGGCTGATGGACCCCTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCCTGCTCATGGAGA
 CAAGTGCAGTCAAGGAATTGCTCTGTTTACCATCTTGATGAGACAAAAGCTGGTACTTCAGTGA
 AAATATGGAAAGAAACTGCAGGGCTCCGCAATATCCAGATGGAGATCCCACCTTTAAAGAGAATTATC
 GCTCCATGCAATCATGCTACATAATGATACTACCTGGCTTACTAATGGCTCAGGATCAAAGGATT
 CGATGGTATCTGCTCAGCATGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTGAGTGGACATGTTGAC
 TGACAGTAAAGAGGAGACTTAAATGGCACTGACAACTCTATCCAGGTGTTTGGAGACAGTG
 TGTTACCATCCTGGAAATTGGCGGGTGAATGCTTATTGGCAGGATCTACATGCTGGATGAGC
 ACACTTTCTGGTGTACGAACTAAGTGTCAAGACTCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATT
 TCAGATTACAGCTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCAAAGCTGGCAGACTTCAATTCCGGATCAA
 TCAATGCTGGCAGGCAACAGGACCTTTCTGGATCAAGGGATCTGTTGGCACCAGTATTTCAC
 GGCATCAAGACCCAGGGTCCCTCAGAAGTCTCAGCTCACATCTCAGTTATCATGATGATAG
 TCTTGATGGAAGAAGTGGCAGACTTATCAGGAAATTGCAACTGGAACCTTAAATGTCCTTGGCAATG
 TGGATTCATCTGGATAAAACAAATTTAACCTCCAAATTGTCGATACATCCGTTTGACCCCA
 ACTCTTATAGCTGGCAGCTCTGGCATGGATTGATGGCTGATTTAAATAGTTGAGCATG
 ATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCAAGACTACTGCTCATCTACTTACCAATATGTTG
 CCACCTGGTCTCCTTCAAAGCTGACTTCACTCCAAAGGGAGGAGTAATGCTGGAGACCTCAGGTGAAT
 AACCTCAAAGACTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCAAGAGTA
 AAAATCTCTGCTTACAGCATGTATGTAAGGAGTCTCTCATCTCAGCAGTCAAGATGCCATCAGTGG
 CTCTCTCTCTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTCAGGGAAATCAAGACTCCTCACACCTGTTGAAC
 TCTCTAGACCCACCGTTACTGACTGCTCACCTCGAATTCCAGGACTTCAAGGAGTGGGTG
 GAGGATGGAGGTTCTGGCTGCGAGGACAGGACTCTACGACAAACTCACACATGCCACCGT
 CTCCAGAACTCTGGCGGACCGTCACTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC
 CGGACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGACGTGAGGACAGAAGGCCCTGAGGTCAAGTCAACTG
 CGTGGACCGCTGGAGGTGATCAATGCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCACTAACACGACCTACCGTG
 TGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
 AAACCCCTCCACCGGGATGAGCTGACCAAGAACCGGCTCAGGCTGACCTGCTGGTCAAAGG
 CACCCCTGCTCTCACCGGAGCAACTACAGACCAAGGCTCC
 ATCCCACGACATGCCGTGGAGGGAGACCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAGACCA
 GTCAGTGGACTCCGACGGCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
 GAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCGATGAGGCTCTGACAACCACACCGCAGAGAGC
 CTCGGGTAAA

Ниже перечислены дополнительные сконструированные фрагменты ФВ и гетеродимеры Ф VIII/ФВ.

Таблица 6

Фрагменты ФВ и гетеродимерные конструкции Ф VIII/ФВ

Конструкция	Описание	Вектор
ФВ		
pSYN-VWF-001	D'D3-область сигнального пептида ФVIII (1-276 аминокислот в длину 6xHis)	pcDNA 4
pSYN-VWF-002	D'D3-область сигнального пептида ФVIII (1-477 аминокислот в длину 6xHis)	pcDNA 4
pSYN-VWF-003	D'D3-область сигнального пептида ФVIII частично A1 (1-511 аминокислот в длину 6xHis)	pcDNA 4
pSYN-VWF-004	D'D3-область сигнального пептида ФVIII (1-716 аминокислот в длину 6xHis)	pcDNA 4
pSYN-VWF-006	D1D2D'D3-линкер-CK1	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-008	Полноразмерный ФВ дикого типа	pcDNA 3.1

pSYN-VWF-009	D1D2D'D3-область (1-276 ак, 6xHis)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-010	D1D2D'D3-область (1-477 ак, 6xHis)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-011	D1D2D'D3-область частична A1 (1-511 ак, 6xHis)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-012	D1D2D'D3A1-область (1-716 ак, 6xHis)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-013	D1D2D'D3 region (1-477 ак, C336A/C379A, 6x His)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-014	Сигнальный пептид ФVIII-D'D3 (1-477ак, C336A/C379A)- одиночная Fc с 20ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-015	D1D2D'D3 (1-477ак, C336A/C379A)- одиночная Fc с 20ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-016	Сигнальный пептид ФVIII-D'D3 (1-477ак, ДТ)-одиночная Fc с 20ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-017	D1D2D'D3 (1-477ак, ДТ)-одиночная Fc с 20ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-025	D1D2D'D3-область (1-477 ак, 6xHis) в pLIVE	pLIVE
pSYN-VWF-029	D1D2D'D3-область (1-477 ак, C336A/C379A, 6x His) в pLIVE	pLIVE
pSYN-VWF-030	Сигнальный пептид ФVIII-D'D3 (1-477ак, C336A/C379A)- одиночная Fc с 48ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-031	D1D2D'D3 (1-477ак, C336A/C379A)- одиночная Fc с 48ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-032	Сигнальный пептид ФVIII-D'D3 (1-477ак, ДТ)- одиночная Fc с 48ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
pSYN-VWF-033	Сигнальный пептид ФVIII-D'D3 (1-477ак, ДТ)- одиночная Fc с 35ак линкером, содержащим сайт тромбина	pcDNA 4
FVIII		
pSYN-FVIII-055	УВД-ФVIII оцFc с R336I и Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-056	УВД-ФVIII оцFc с R336I, R562 и Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-057	УВД-ФVIII оцFc с Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-058	УВД-ФVIII оцFc с S488A	pBUD
pSYN-FVIII-059	УВД-ФVIII оцFc с R336I, R562K, S488A	pBUD
pSYN-FVIII-060	УВД-ФVIII оцFc с R336I, R562K, Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-061	УВД-ФVIII оцFc с R336I, R562K, S488A, Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-064	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-065	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-276ак) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-083	УВД-ФVIII оцFc с R336I, S488A, R562K, Y1680F, E1984V	pBUD
pSYN-FVIII-086	УВД-ФVIII оцFc 6x(GGGGS) линкером между C2 ФVIII и Fc	pBUD
pSYN-FVIII-095	УВД-ФVIII оцFc с S104C, R562K, Y1680F, G1960C	pBUD
pSYN-FVIII-101	УВД-ФVIII оцFc из ФVIII-041 в пцДНК 3.3. Торо	pcDNA 3.3 Торо
pSYN-FVIII-102	УВД-ФVIII (M662C/D1828C для дисульфидной связи; APC мутации расщепления R336I/R562K; вместе с мутацией Y1680F для связывания ФВ)	pBUD
pSYN-FVIII-103	УВД-ФVIII оцFc (Y662C/T1828C)	pBUD
pSYN-FVIII-104	УВД-ФVIII оцFc (G655C/T1788C)	pBUD
pSYN-FVIII-113	УВД-ФVIII (R490A/H497A) отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-114	УВД-ФVIII (R490A/H497A) отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-276) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-126	УВД-ФVIII оцFc (M662C/D1828C)	pcDNA 3.3 Торо

pSYN-FVIII-127	УВД-ФVIII оцFc (M662C/D1828C для дисульфидной связи; АРС мутации расщепления R336I/R562K; вместе с мутацией Y1680F для связывания ФВ)	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-128	УВД-ФVIII оцFc (Y664C/T1826C)	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-129	мутация R336I R562K R490A H497A N1224A на фоне pSYN-VIII-64	pBUD
pSYN-FVIII-130	мутация R336I R562K R490A H497A N1224A на фоне pSYN-VIII-65	pBUD
pSYN-FVIII-131	мутация R471A Y487A R490A H497A N1224A на фоне pSYN-VIII-64	pBUD
pSYN-FVIII-132	мутация R471A Y487A R490A H497A N1224A на фоне pSYN-VIII-65	pBUD
pSYN-FVIII-135	УВД-ФVIII оцFc с R1645A/R1648A	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-136	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-137	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-276ак) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-145	УВД-ФVIII оцFc с R471A/Y487A, R490A/H497A	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-146	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R471A/Y487A) с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-147	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R471A/Y487A) с ФВ D'D3 (1-276ак) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-148	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R1645A/R1648A) с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-149	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R1645A/R1648A) with ФВ D'D3 (1-276ак) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-155	УВД-ФVIII сшитый с одиночной Fc (R1645A/R1648A)	pcDNA 4
pSYN-FVIII-159	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R490A/H497A, R1645A/R1648A) с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 35ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-160	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R490A/H497A, C336A/C379A) на второй Fc и 48ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-164	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R490A/H497A, R1645A/R1648A) с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-165	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc (R336I/R562K, R490A/H497A, R1645A/R1648A) с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 20ак тромбин-отщепляемым линкером	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-178	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 73ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-179	УВД-ФVIII отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 98ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-180	УВД-ФVIII (K2092A) отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 48ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-181	УВД-ФVIII (F2093A) отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 48ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD
pSYN-FVIII-182	УВД-ФVIII (K2092A/F2093A) отщепляемая оцFc с ФВ D'D3 (1-477ак, C336A/C379A) на второй Fc и 48ак тромбин-отщепляемым линкером между ними	pBUD

Пример 6. Белковая очистка.

Белковая очистка фрагментов ФВ.

Фрагменты ФВ очищали с применением двухэтапного метода очистки. Для первичной очистки использовали заряженную колонку с сульфатом никеля для афинной хроматографии на иммобилизованном металле (АХИМ), а для окончательной очистки использовали ионообменную колонку с ДЭАЭ-фрактогелем. Ниже детально описан способ очистки.

(а) Первичная очистка фрагмента ФВ на АХИМ никеле 14 мл никелевую АХИМ колонку с НР-сепарозой [ХК26/3] уравновешивали 25 mM ГЭПЭС, 500 mM NaCl, 10 mM имидазола и 0,05% Твин-20 @ pH 7,5. Приблизительно 7,2 л ФВ-кондиционированной среды доводили 100 мл 1M ГЭПЭС @ pH 7,5 и 600 мл 5M NaCl. Затем добавляли 80 мл 1M имидазола (@ pH 7,5) до достижения конечной концентрации в 10 mM. Затем 7,8 л доведенной ФВ-кондиционированной среды загружали в колонку при 2-8°C при 10 мл/мин [113 см/ч]. Этапы отмывки проводили при 13,3 мл/мин [150 см/ч]. Сначала проводили отмывку 2× объемов колонки (OK) с 25 mM ГЭПЭС, 500 mM NaCl, 10 mM имидазола и 0,05% Твин-20 @ pH 7,5 в нормальном потоке {"нисходящем потоке"}. Затем проводили отмывку 3×OK с 25 mM ГЭПЭС, 500 mM NaCl, 10 mM имидазола и 0,05% ТВИН-20 @ pH 7,5 в обратном потоке {"восходящем потоке"}. И наконец, проводили отмывку 3×OK с 25 mM ГЭПЭС, 500 mM NaCl, 10 mM имидазола и 0,05% Твин-20 @ pH

7,5 в нормальном потоке {"нисходящем потоке"}. Элюирование проводили как градиент 10×ОК до 50% B1 (25 мМ ГЭПЭС, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазола и 0,05% ТВИН-20 @ pH 7,5). Объем фракции положили равным 10 мл. Затем колонку очищали 100% B1. После этого проводили отмывку с 25 мМ ГЭПЭС, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола и 0,05% Твин-20 @ pH 7,5. Вторую очистку проводили с 1Н NaOH. Затем колонку промывали с 1М ТРИС, 1М NaCl @ pH 7,8, и после этого 25 мМ ГЭПЭС, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола и 0,05% Твин-20 @ pH 7,5. В конце колонку промывали с 5 ОК из ФСБД + 20% этанола и хранили при 4°C.

(б) Вторичная очистка фрагмента ФВ на ДЭАЭ-фрактогеле.

Вторичную очистку фрагмента ФВ проводили на ДЭАЭ-фрактогеле @ pH 7,5. Сначала 20 мл элюата АХИМ никеля (что соответствует пику фрагмента ФВ) доводили 200 мг цвиттергента 3-14 цвиттерионного детергента, чтобы попытаться разделить агрегированные частицы без применения денатурации или восстановительных добавок. После растворения детергента белок оставляли при комнатной температуре приблизительно на 15 мин. Затем белок доводили 4 г трегалозы, 1 мл 10% Твин-20, 5 мл 1М ГЭПЭС @ pH 7,5 и 174 мл воды "Милли-Кью". Равновесный буфер "A12" содержал 25 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, 1% трегалозы, 0,05% Твин-20 @ pH 7,5. Элюирующий буфер "B1" содержал 25 мМ ГЭПЭС, 1000 мМ NaCl, 1% трегалозы, 0,05% Твин-20 @ pH 7,5. Элюирование проводили как градиент 10 ОК до 50% B1 с удерживанием 5+ ОК после чего следовал этап доведения до 100% B1. Затем колонку очищали 0,85% ортофосфорной кислоты, и после этого 1М ТРИС, 1М NaCl @ pH 7,5. Затем колонку очищали 1Н NaOH, 2М NaCl и после этого 1М ТРИС, 1М NaCl @ pH 7,5. Затем колонку промывали с 25 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl + 20% этанола @ pH 7,5 для хранения.

(с) Белковая очистка гетеродимера Ф VIII-ФВ.

Сначала гетеродимер Ф VIII-ФВ очищали на аффинной колонке (GE VIII Select), после чего проводили очистку на ионообменной колонке содержащей фрактогель TMAE. (McCue J.T., Selvitelli K., Walker J., Jchromatogr A. 2009 Nov 6; 1216(45):7824-30. Epub 2009 Sep 23).

Для очистки Ф VIII-155/ФВ-31 проводили этап тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) для замены буфера очищаемой кондиционированной среды. Затем при помощи аффинной хроматографии проводили захват целевых белков в фильтрате. После этого проводили этап слабой анионообменной хроматографии для уменьшения количества высокомолекулярных компонентов. Чистоту и размер молекул оценивали при помощи эксклюзионной ВЭЖХ и ДСН-ПААГ. Наличие разных доменов Ф VIII-155/ФВ-31 дополнительно подтверждало Вестерн-блоттингом. Специфическая активность молекул была сравнима с Ф VIII с удаленным В-доменом.

(г) Расщепление тромбином гетеродимера Ф VIII-ФВ (фиг. 8).

Гетеродимер Ф VIII-ФВ или Ф VIII-Fc (контроль) смешивали с тромбином в соотношении 1:10 в тромбин-расщепляющем буфере (50 мМ Трис, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5% глицерола). Реакцию инкубировали при 37°C на протяжении 20 мин. Расщепленный продукт проводили в 4-12% восстановительном трис-глициновом геле. Нерасщепленный белок использовали в качестве контроля. Полосы визуализировали красителем кумасси.

(д) Оценка ФВ-связывающей способности Ф VIII-155/ФВ-31 при помощи октетного анализа.

ФВ-связывающую способность Ф VIII-155/ФВ-31 определяли при помощи измерений на основе биослоевой интерферометрии (БСИ) (октетный анализ) при 25°C при помощи измерительной установки ForteBio Octet 384 с использованием буферного раствора Трис (50 мМ Tris, pH 7,2, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂). Октетный анализ для определения связывания Ф VIII основан на гидрофобной иммобилизации человеческого фактора Виллебранда (чФВ) (Haematologic Technologies, Каталог № HCVWF-0191) на АФС-биосенсоре, за которой следует связывание 1,0% бычьего сывороточного альбумина (Jackson ImmunoResearch, Каталог № 001-000-161). Вкратце, чФВ (38,5 нМ) растворяли в Трис-буфере и загружали на АФС-биосенсоры на 600 с, получая приблизительно 3,0-3,5 нМ связывание на реакционных зондах. Контрольные АФС-зонды загружали 1,0% БСА в отсутствие чФВ для базового вычитания. После загрузки все зонды инкубировали в Трис-буфере на протяжении 300 с для установления новой базовой линии. После этого биосенсорные зонды инкубировали в растворах Ф VIII-155/ФВ-031 лекарственного вещества с содержанием Ф VIIIIFc или рФ VIII (60 нМ) на протяжении 5 мин при комнатной температуре с последующим 5-минутным этапом диссоциации. При помощи программного обеспечения для октетного анализа данных связывающий отклик (нМ) получали путем вычетания данных (реакционный зонд минус контрольный зонд). Как показано на фиг. 15, по сравнению с ФВ-связывающей активностью рФ VIIIIFc и рФ VIII ФВ-связывающая активность Ф VIII-155/ФВ-031 является значительно более слабой. Это указывает на успешное экранирование Ф VIII от полноразмерного ФВ фрагмента D'D3 гетеродимера Ф VIIIIFc/ФВ.

Пример 7. ФВ-Ф VIII взаимодействие является ограничивающим фактором для продления времени полужизни Ф VIII.

Большая часть циркулирующего Ф VIII существует в виде комплекса Ф VIII-ФВ (>95% плазменного Ф VIII). Это Ф VIII-ФВ взаимодействие способствует выведению Ф VIII в процессе выведения ФВ, тем самым делая время полужизни ФВ ($T_{1/2}$) ограничителем для продления времени полужизни Ф VIII. Для оценки этой гипотезы при помощи Fc-технологий проводили испытания по ограничению продления

времени полужизни Ф VIII у мышей с дефицитом Ф VIII (мышей с гемофилией А, которые имеют интактный ген ФВ) и у мышей с дефицитом Ф VIII/ФВ (с двойным Ф VIII-ФВ генным нокаутом (ДГН)).

Мышей с гемофилией А или Ф VIII-ФВ ДГН мышей лечили путем введения единичной внутривенной дозы рФ VIII или рФ VIIIIFc в рассчете 125 МЕ/кг в случае мышей с гемофилией А или 200 МЕ/кг в случае ДГН мышей. Образцы крови брали до 72 ч у мышей с гемофилией А или до 8 ч у Ф VIII/ФВ ДГН мышей. Затем измеряли активность Ф VIII в образцах плазмы крови при помощи хромогенного анализа Ф VIII. Фармакокинетический (ФК) профиль двух вариаций рФ VIII анализировали при помощи программы WinNonline.

Как показано в табл. 7 и на фиг. 9, для Ф VIII/ФВ ДГН мышей рФ VIIIIFc продемонстрировал приблизительно в 4,8 раза большее $T_{1/2}$ (т.е. $T_{1/2}$ в 1,2 ч) по сравнению с $T_{1/2}$ рФ VIII (т.е. $T_{1/2}$ в 0,25 ч). В противоположность этому при испытаниях на мышах с гемофилией А рФ VIIIIFc имел только в 1,8 раза большее $T_{1/2}$ по сравнению с рФ VIII. $T_{1/2}$ рФ VIIIIFc составило 13,7 ч, что совпадает со временем полужизни эндогенного мышного ФВ. Это указывает на то, что Ф VIII-ФВ взаимодействие является ограничивающим фактором для продления времени полужизни Ф VIII. Для того чтобы достичь более чем двукратного увеличения времени полужизни Ф VIII, Ф VIII-ФВ, взаимодействие должно быть устранено.

Таблица 7

ФК Ф VIII для мышей с гемофилией А и Ф VIII/ФВ ДГН мышей

Тестируемая молекула	Мыши с дефицитом ФVIII		Мыши с дефицитом ФVIII/ФВ	
	$T_{1/2}$ (ч)	Соотношение $T_{1/2}$ к рФVIII	$T_{1/2}$ (ч)	Соотношение $T_{1/2}$
рФVIII	7,6	1	0,25	1
рФVIIIIFc	13,7	1,8	1,2	4,8

Хромогенный анализ Ф VIII.

Активность Ф VIII определяли при помощи набора инструментов COATEST SP FVIII от DiaPharma (lot# N089019), а все инкубирования проводили на плоском нагревателе при 37°C с встряхиванием.

Диапазон калибровочной пробы рФ VIII составлял от 100 до 0,78 мМЕ/мл. Смешанные образцы контрольной нормальной человеческой плазмы и плазмы (разведенные в 1Х буфере Coatest) добавляли в 96-луночные планшеты Immulon 2HB в дубликате (25 мкл/лунку). Свежеприготовленную смесь IXa/ФХ/фосфолипид (50 мкл), 25 мкл 25 mM CaCl₂ и 50 мкл субстрата ФХа последовательно добавляли в каждую лунку с 5 мин инкубации между добавлениями. После инкубации с субстратом добавляли 25 мкл 20% уксусной кислоты для терминации цветной реакции и измеряли поглощение OD405 при помощи установки SpectraMAX plus (Molecular Devices). Данные анализировали при помощи программного обеспечения SoftMax Pro (версия 5.2). Нижний предел количественного определения (НПКО) равен 7,8 мМЕ/мл.

Пример 8. Димер ФВ D'D3 защищает Ф VIII от Ф VIII-протеолиза и выведения (фиг. 10).

Ф VIII-защитную активность фрагментов ФВ оценивали по их способности защищать эндогенный мышный Ф VIII от выведения у мышей с дефицитом ФВ. В циркуляцию крови мышей с дефицитом ФВ вводили разные фрагменты ФВ, перечисленные в табл. 8, колонка 1 (фиг. 1, пример 1), при помощи гидродинамической инъекции соответствующих конструкций ДНК в рассчете 100 мкг/мышь. Образцы плазмы крови брали через 48 ч после инъекции, а плазменную активность мышного Ф VIII измеряли при помощи хромогенного анализа Ф VIII. Уровень экспрессии ФВ измеряли при помощи ELISA ФВ.

Исследовали четыре фрагмента ФВ разной длины, составляющей 276, 477, 511 и 716 аминокислот. Диапазон аминокислот от 276 до 716 исследовали, чтобы определить длину фрагментов ФВ, которая требуется для связывания Ф VIII (276 ак) в отсутствие связывающего домена клиренс-рецептора ФВ (716 ак). Полноразмерный ФВ и мультимер D1D2D'D3CK использовали в качестве положительного контроля для защиты Ф VIII. В циркуляции крови фрагменты ФВ, синтезированные с доменом D1D2, существуют в виде димера и в виде мономеров, если они синтезированы без доменов D1D2.

Повышение активности мышного Ф VIII в плазме крови после гидродинамической инъекции определяет Ф VIII-защитное действие фрагментов ФВ. Как показано в табл. 8 и на фиг. 10А-Б, первые 276 ак фрагмента D'D3 не проявляют Ф VIII-защитной активности, что демонстрируют одинаковые уровни Ф VIII в плазме крови до/после инъекции (фиг. 10А). При этом введение других фрагментов ФВ привело к значительному повышению уровня Ф VIII в плазме крови, что указывает на то, что эти фрагменты ФВ могут защищать Ф VIII от выведения.

Таблица 8

Уровень мышиного Ф VIII в плазме крови Ф VIII/ФВ ДГН мышей до/после введения фрагментов ФВ (конструкции ДНК проиллюстрированы на фиг. 1)

Конструкция ДНК	Кодирующий Фрагмент ФВ	Активность ФVIII -до (мМЕ/мЛ)		Активность ФVIII -48 ч (мМЕ/мЛ)		ФВ антиген-48 ч (нМ/мЛ)	
		Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО
VWF-001	D'D3 _{276aa}	53	31	86	16	2,8	1,9
VWF-009	D1D2D'D3 _{276aa}	45	20	65	17	1,8	1,3
VWF-002	D'D3 _{477aa}	56	3	257	38	17,0	0,5
VWF-010	D1D2D'D3 _{477aa}	42	11	387	22	8,2	1,6
VWF-003	D'D3A1 _{511aa}	88	21	253	47	12,9	2,2
VWF-011	D1D2D'D3A1 _{511aa}	63	42	360	15	9,3	2,3
VWF-004	D'D3A1 _{716aa}	87	8	239	56		
VWF-012	D1D2D'D3A1 _{716aa}	64	22	307	29		
VWF-006	D1D2D'D3CK	38	10	249	20	2,4	1,0
VWF-008	Полноразмерный ФВ	51	8	380	41	10,6	2,3

В табл. 8 приведены значения активности плазменного Ф VIII и плазменный уровень антигена фрагментов ФВ, которые содержат домен D'D3 полноразмерного ФВ, после инъекции. Аналогичные по-слеинъекционные значения Ф VIII/ФВ наблюдали для полноразмерного ФВ и двух димерных форм фрагментов ФВ, что означает, что эти два димера фрагментов ФВ обеспечивают такую же защиту Ф VIII, что и полноразмерный ФВ. Вдобавок, трехкратно превышающее значение Ф VIII/ФВ наблюдали для димерных изоформ фрагмента ФВ по сравнению с соответствующими им мономерами: димер D'D3 (477 ак) характеризуется значением Ф VIII/ФВ в 38,7 мМЕ/нмоль; мономер D'D3 (477 ак) характеризуется значением Ф VIII/ФВ в 11,6 мМЕ/нмоль: димер D'D3A1 (511 ак) характеризуется значением Ф VIII/ФВ в 32,9 мМЕ/нмоль; и мономер D'D3 (511 ак) характеризуется значением Ф VIII/ФВ в 13,8 мМЕ/нмоль, что указывает на то, что димерные изоформы фрагментов ФВ обеспечивают лучшую защиту Ф VIII по сравнению с соответствующими им мономерами.

Таблица 9

Эффект защиты Ф VIII полноразмерным фрагментом D'D3

Конструкция ДНК	Кодирующий Фрагмент ФВ	Форма мультимера	ФVIII/ФВ (мМЕ/нмоль)	
			Среднее	(СО)
VWF-002	D'D3 _{477aa}	Мономер	11,6	(4,4)
VWF-010	D1D2D'D3 _{477aa}	Димер	38,7	(11,7)
VWF-003	D'D3A1 _{511aa}	Мономер	13,8	(1,3)
VWF-011	D1D2D'D3A1 _{511aa}	Димер	32,9	(5,5)
VWF-008	Полноразмерный ФВ	Мультимер	31,1	(6,7)

Гидродинамическая инъекция.

Гидродинамическая инъекция является эффективным и безопасным методом доставки генов в печень небольших животных, таких как мыши и крысы. Впервые он был описан как быстрая инъекция чистой плазмидной ДНК/солевого раствора без содержания эндотоксинов в размере десятой части от массы тела животного, проводимая за 5-7 с. Чистая плазмидная ДНК содержит представляющий интерес ген, а целевой белок, вырабатываемый в печени из инъектированной ДНК, можно обнаружить в пределах 24 ч после инъекции. Затем образцы плазмы крови брали для изучения терапевтических свойств экспрессируемого белка.

Во всех гидродинамических инъекциях, которые проводили в рамках данной патентной заявки, мышам массой 20-35 г в течении 4-7 с путем внутривенной инъекции в хвостовую вену доставляли 2 мл плазмидной ДНК в 0,9% стерильном солевом растворе. За мышами внимательно наблюдали на протяжении первых нескольких часов до тех пор, пока не восстанавливалась нормальная активность. После того как при помощи метода отбора образцов крови из ретроорбитального синуса образцы крови были взяты, из них получали образцы плазмы крови и хранили при -80°C для дальнейшего анализа.

ELISA ФВ.

Для ELISA ФВ использовали козлиное антитело к ФВ (аффинно очищенное, аффинно биологическое, КАФВ-АО) в качестве иммобилизованного антитела в количестве 0,5 мкг/лунку, а ФВ-ИФА-Д (Affinity Biologicals, ФВ-ИФА-Д, разведение 1:100) использовали в качестве детектирующего антитела. Анализ ELISA проводили согласно стандартной процедуре ELISA, в качестве субстрата ПХ использовали ТМБ, в качестве блокирующего и связывающего буфера использовали буфер ФСБТ/1,5% БСА/0,5М NaCl. Стандартный диапазон анализа составляет от 100 до 0,78 нг, а нижний предел количественного определения (НПКО) в анализе равен 7,8 нг/мл.

Пример 9. Совместное введение полноразмерного D'D3-фрагмента ФВ продлевает время полужизни рУВД-Ф VIII у Ф VIII-ФВ ДГН мышей.

Пример 8 продемонстрировал, что полноразмерный фрагмент D'D3 может защитить эндогенный Ф VIII от процесса его выведения. Для того чтобы дополнительно оценить Ф VIII-защитную активность белка D'D3, Ф VIII-ФВ ДГН мышам вводили совместно Ф VIII с удаленным В-доменом (рУВД-Ф VIII) и димер D'D3 (ФВ-010) или рУВД-Ф VIII и мономер D'D3 (ФВ-002) при помощи внутривенной инъекции в расчете 200 МЕ/кг для рУВД-Ф VIII, 770 мкг/кг для димера D'D3 и 590 мкг/кг для мономера D'D3. ФК профиль рУВД-Ф VIII изучали по его плазменной активности после инъекции. Из-за короткого *in vivo* времени полужизни фрагментов D'D3 через три часа после первичной совместной инъекции вводили еще одну дозу D'D3 тем же самым путем для того, чтобы поддерживать необходимый уровень D'D3 в плазме крови.

Для анализа ФК образцы плазмы крови получали при помощи метода отбора образцов крови из ретроорбитального синуса через 5 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч и 6 ч после инъекции, активность плазменного Ф VIII и уровень антитела D'D3 анализировали при помощи хромогенного анализа Ф VIII и ELISA ФВ.

Как показано на фиг. 11 и в табл. 10, мономер D'D3 продлил время полужизни рУВД-Ф VIII в 2,5 раза и улучшил его восстановление в 1,8 раза. Димер D'D3 продлил время полужизни рУВД-Ф VIII в 4,1 раза и улучшил его восстановление в 3,5 раза. Также для обеих изоформ наблюдали улучшенные параметры среднего времени нахождения, выведения и ППК. При этом димер D'D3 показывал лучшие результаты по всем ФК параметрам по сравнению со своей мономерной формой.

Таким образом, совместное введение полноразмерного D'D3 защищает Ф VIII от процесса выведения, что показывает улучшение профиля ФК рУВД-Ф VIII. Потенциальное клиническое значение этого открытия нуждается в дополнительной оценке.

Таблица 10

Параметры ФК рУВД-Ф VIII у Ф VIII-ФВ ДГН мышей при совместном введении им фрагментов D'D3

Лечение	5 мин Восстанов- ление (%)	T _{1/2} (ч)	СВН (ч)	Вывед. (мЛ/ч/кг)	Орс (мЛ/кг)	ППК Д (ч*кг*мМЕ/ мЛ/мМЕ)	T _{1/2} Кратность увеличения	Восстанов- ление Кратность увеличения
rBDD-FVIII	25	0,23	0,24	407,72	133,14	0,0025		
rBDD-FVIII VWF-002	44	0,57	0,58	151,93	124,63	0,0066	2,5	1,8
rBDD-FVIII VWF-010	87	0,95	0,98	71,48	97,54	0,014	4,1	3,5

Пример 10. Мономер D'D3, синтезированный с доменом D1D2, и его димерная изоформа обладают такой же Ф VIII-защитной активностью и дополнительно продлевают время полужизни Ф VIIIIFc приблизительно в ~4 раза у Ф VIII-ФВ ДГН мышей.

Для того чтобы количественно оценить Ф VIII-защитную способность доменов D'D3 и выяснить, является ли димеризация D'D3 необходимой для Ф VIII-защитной активности, каждую из двух конструкций ДНК (т.е. ФВ-025 (содержащую последовательность ДНК, кодирующую D1D2D'D3) и ФВ-029 (содержащую D1D2D'D3 кодон ДНК с мутациями C336A и C379A)) вводили Ф VIII/ФВ ДГН мышам путем гидродинамической инъекции. Эта инъекция приводила к экспрессии димера D'D3 (ФВ-025) или экспрессии мономера (ФВ-029) у Ф VIII/ФВ ДГН мышей. На 5 день после гидродинамической инъекции вводили единичную внутривенную дозу рФ VIIIIFc в расчете 200 МЕ/кг, а образцы плазмы крови брали через 5 мин, 4, 8, 16, 24, 31, 40, 55, 66 ч после инъекции рФ VIIIIFc IV. Исследование ФК рФ VIIIIFc, проводимое на ранее не подвергавшихся экспериментам Ф VIII-ФВ ДГН мышах с аналогичными дозировками, использовалось в качестве базовой линии времени полужизни рФ VIIIIFc. Активность плазменного Ф VIII анализировали при помощи хромогенного анализа Ф VIII. Плазменный уровень D'D3 измеряли при помощи ELISA ФВ, а ФК профиль рФ VIIIIFc анализировали при помощи программы WinNonlin.

Как показано в табл. 11 и на фиг. 12, при наличии в циркуляции D'D3-фрагментов ФВ исходное восстановление рФ VIIIIFc возрастает от 42 до 75% для димера D'D3 и 60% для мономера D'D3. T_{1/2} для рФ VIIIIFc также возросло от 2,5 до 9,3 и 9,2 ч соответственно. Вместе с T_{1/2} наблюдали улучшенные параметры среднего времени нахождения, выведения и объемного распределения у мышей, экспрессирующих мономеры и димеры D'D3. В целом, наблюдали приблизительно 8-кратное увеличение времени

полужизни рФ VIIIIFc и 6-кратное увеличение ППК у мышей, экспрессирующих мономеры и димеры D'D3. Так же, как и его димерная изоформа, мономер D'D3 полноразмерного ФВ, который синтезировали с пропептидом (D1D2) ФВ, может обеспечивать полный Ф VIII-защитный эффект, что и полноразмерная молекула ФВ.

У Ф VIII/ФВ ДГН мышей Ф VIII дикого типа имеет 0,25 ч $T_{1/2}$. Метод слияния Fc повышает $T_{1/2}$ Ф VIII до 1,2 ч, что является приблизительно 4,8-кратным увеличением. Когда метод слияния Fc объединили с доменами D'D3, $T_{1/2}$ Ф VIII возросло до 9,3 ч (димер D'D3) и 9,2 ч (мономер D'D3), что в целом является приблизительно 37-кратным увеличением (табл. 10). Этот результат демонстрирует синергетический эффект слияния Fc и D'D3-фрагмента ФВ на продление времени полужизни Ф VIII.

Таблица 11

ФК параметры рФ VIIIIFc с/без фрагмента D'D3 в циркуляции крови

Лечение	5 мин Восстановление (%)	$T_{1/2}$ (ч)	СВН (ч)	Вывед. (мЛ/ч/кг)	Орс (мЛ/кг)	ППК_Д (ч*кг*мМЕ/мЛ/мМЕ)	$T_{1/2}$ Кратность увеличения	ППК Д Кратность увеличения
rFVIIIIFc	43	1,2	0,76	39,5	67,0	0,025		
rFVIIIIFc VWF-025	75	9,3	11,1	6,1	67,6	0,164	7,8	6,6
rFVIIIIFc VWF-029	60	9,2	11,3	6,7	75,7	0,149	7,7	6,0

Пример 11. ФК гетеродимеров Ф VIII-ФВ у мышей с гемофилией А.

На мышах с гемофилией А проводят исследование ФК профиля основных представителей гетеродимеров Ф VIII-ФВ (таких как Ф VIII-155/ФВ-031) для того, чтобы оценить их способность экранировать Ф VIII от эндогенного ФВ и их способность продлевать время полужизни Ф VIII.

Мышей с гемофилией А обрабатывают единичной внутривенной дозой основных представителей в расчете 200 МЕ/кг, затем берут образцы плазмы крови через 5 мин, 4 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 120 ч, исследуют активность плазменного Ф VIII при помощи хромогенного анализа Ф VIII, а изменение времени полужизни Ф VIII рассчитывают при помощи программы WinNonlin.

В оптимальной конфигурации гетеродимера Ф VIII/ФВ, связывание Ф VIII с эндогенным ФВ будет полностью подавляться, следовательно, базовая линия времени полужизни рФ VIII снизится от 7,6 до 0,25 ч, как показано в примере 7. При нековалентном соединении фрагмента D'D3 с Ф VIII наблюдали приблизительно 8-кратное увеличение времени полужизни (пример 9). У основных представителей гетеродимеров Ф VIII/ФВ фрагмент ФВ ковалентно соединен с молекулой Ф VIII, соответственно, должна быть достигнута лучшая защита Ф VIII. Изобретение, описанное в данной заявке, открывает двери дальнейшему продлению времени полужизни Ф VIII за границу двукратного увеличения с применением доступных способов продления времени полужизни, пациенты с гемофилией А в ближайшем будущем могут надеяться на вариант Ф VIII более длительного действия.

На мышах с гемофилией А и Ф VIII/ФВ ДГН мышах исследовали ФК профиль Ф VIII-155/ФВ-031 для того, чтобы оценить способность фрагмента D'D3 экранировать компонент Ф VIII от эндогенного ФВ. Мышей с гемофилией А и Ф VIII/ФВ ДГН мышей лечили единичной внутривенной дозой Ф VIII-155/ФВ-031 в расчете 200 МЕ/кг, затем брали образцы плазмы крови через 5 мин, 8 ч, 24 ч и 48 ч после дозирования. Ф VIII-активность образца плазмы исследовали при помощи хромогенного анализа Ф VIII, а время полужизни Ф VIII-155/ФВ-031 рассчитывали при помощи программы WinNonlin.

Методом биослосовой интерферометрии для Ф VIII-155/ФВ-031 по сравнению с рФ VIIIIFc и рФ VIII было зарегистрировано очень слабое связывание с иммобилизованным ФВ (фиг. 15, Октет; ForteBio Inc., Менло-Парк, Калифорния). Это показывает, что домен D'D3 в молекуле успешно блокирует связывание Ф VIII с нативными молекулами ФВ. Следовательно, ожидается, что для двух разных мышиных линий времени полужизни рФ VIII-155/ФВ-031 будут сходными. Результаты исследования приведены на фиг. 16 и в табл. 12А. Как и предсказывалось, ФК профайл рФ VIII-155/ФВ-031 сравним в обоих случаях - мышей с гемофилией А и Ф VIII/ФВ ДГН мышей, что указывает на то, что время полужизни гетеродимера Ф VIIIIFc/ФВ не зависит от времени полужизни эндогенного ФВ. Результаты показывают, что давление взаимодействия рФ VIIIIFc с эндогенным ФВ D'D3-доменами ФВ дает возможность снять ограничение по времени полужизни Ф VIII и открывает возможность продления времени полужизни Ф VIII за границы времени полужизни, достигаемые в отсутствие D'D3-доменов ФВ (приблизительно в два раза по сравнению с Ф VIII дикого типа).

Таблица 12А

ФК Ф VIII-155/ФВ-031 у Ф VIII/ФВ ДГН мышей и мышей с гемофилией А

Лечение	5 мин Восстановление (%)	T _{1/2} (ч)	СВН (ч)	Вывед. (мЛ/ч/кг)	Орс (мЛ/кг)	ППК_Д (ч*кг*мМЕ/мЛ/мМЕ)
FVIII-155/VWF-031 DKO	49	9,9	6,9	11,6	80,5	0,09
FVIII-155/VWF-031 HemA	69	10,8	707	11,9	92,1	0,08

Ф VIII-защитную способность доменов D'D3 оценивали путем сравнения t_{1/2} для Ф VIII-155/ФВ-031 с Ф VIIIIFc у Ф VIII/ФВ ДГН мышей. После одноразового введения IV брали образцы крови через 5 мин, 8 ч, 24 ч и 48 ч для Ф VIII-155/ФВ-031 и через 5 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч и 8 ч для Ф VIIIIFc. Активность Ф VIII образцов плазмы крови исследовали при помощи хромогенного анализа Ф VIII, а время полужизни Ф VIII-155/ФВ-031 рассчитывали при помощи программы WinNonlin.

Фиг. 16Б и табл. 12Б демонстрируют значительно улучшенный ФК профиль для Ф VIII-155/ФВ-031 по сравнению с рФ VIIIIFc для ДГН мышей: приблизительно 6-кратное увеличение для t_{1/2} и приблизительно 5-кратное увеличение для параметров выведения и ППК. Этот результат демонстрирует, что домен D'D3 гетеродимера Ф VIIIIFc/ФВ защищает компонент Ф VIII от некоторых процессов выведения, обеспечивая, таким образом, часть защиты, которую обычно обеспечивает полноразмерный ФВ. Этот вывод был также подтвержден в случае мышей с гемофилией А. По сравнению с рФ VIIIIFc у мышей с гемофилией А рФ VIII-155/ФВ-031 имеет более короткое t_{1/2} и меньшую ППК, что означает, что в такой конфигурации домены D'D3 (ФВ-031) успешно предотвращают связывание белка Ф VIII (рФ VIII-155) с эндогенным ФВ, который до определенной степени обладает свойствами продления времени полужизни, равно как и свойствами, ограничивающими время полужизни Ф VIII. Полноразмерный ФВ имеет длину в 250 кДа и образует мультимеры так, что эндогенный ФВ может иметь длину до 2 МДа, и, таким образом, это согласуется с гипотезой о том, что в данном контексте D'D3-участок ФВ длиной в 55 кДа не обеспечивает защиту в той же степени, в какой ее предоставляет гораздо более крупный эндогенный ФВ. Так как фрагмент ФВ предотвращает связывание эндогенным ФВ рФ VIII-155/ФВ-031, в этой конкретной конструкции время полужизни у мышей с гемофилией А сокращается. Следовательно, результаты, приведенные в табл. 12Б, указывают на то, что молекула рФ VIII-155/ФВ-031 способна предотвращать связывание рФ VIII-155/ФВ-031 с компонентом, продлеваяющим время полужизни Ф VIII (эндогенным ФВ). При этом эксперименты показывают, что устранение фактора, ограничивающего время полужизни Ф VIII, открывает возможность продления времени полужизни белка Ф VIII за пределы ранее осуществляемого 1,5-кратного или 2-кратного увеличения. Комбинируя Ф VIII с другими продлеваящими время полужизни элементами, можно выйти за ограничение на более чем 2-кратное продление времени полужизни.

Таблица 12Б

ФК рФ VIII-155/ФВ-031 и Ф VIIIIFc у Ф VIII/ФВ ДГН мышей

Лечение	5 мин Восстановление (%)	T _{1/2} (ч)	СВН (ч)	Вывед. (мЛ/ч/кг)	Орс (мЛ/кг)	ППК_Д (ч*кг*мМЕ/мЛ/мМЕ)
FVIIIIFc DKO	43	1,6	1,9	63,9	123,2	0,02
FVIII-155/VWF-031 DKO	49	9,9	6,9	11,6	80,5	0,09
Fold Increase		6,2	3,6	5,5		4,5
FVIII-155/VWF-031 HemA	69	10,8	7,7	11,9	92,1	0,08
FVIIIIFc HemA	86	16,4	20,3	2,9	57,7	0,35

Пример 12. Оптимизация D'D3-Fc линкера гетеродимера Ф VIII/D'D3 (фиг. 13).

Для того чтобы обеспечить возможность рФ VIIIIFc избежать процесса выведения ФВ и устраниТЬ

ограничение в виде 2-кратного увеличения времени полужизни Ф VIII, D'D3-фрагмент ФВ вносили в молекулу рФ VIIIIFc (фиг. 2), что приводило к образованию гетеродимера Ф VIIIIFc/ФВ. Чтобы исключить взаимодействие между рФ VIIIIFc и эндогенным ФВ и максимизировать Ф VIII-защитный потенциал D'D3, между доменом D'D3 и Fc-областью добавляли линкер, чтобы обеспечить возможность оптимального связывания Ф VIII/D'D3. Более оптимальный линкер обеспечит домену D'D3 возможность предоставить большую защиту D'D3, чем это делает менее оптимальная конструкция линкера. Это предположение можно проверить путем проведения гидродинамической инъекции конструкций ДНК Ф VIII/ФВ ДГН мышам. Более оптимальная конструкция приведет к более стабильной экспрессии гетеродимера Ф VIIIIFc/D'D3.

Для того чтобы выбрать оптимальный линкер было создано три разных гетеродимера Ф VIIIIFc/D'D3 (фиг. 3, пример 3). Возможные линкеры между доменами D'D3 и Fc-областью перечислены в табл. 13. Данные конструкции ДНК вводили Ф VIII/ФВ ДГН мышам при помощи гидродинамической инъекции (ГДИ) в расчете 100 мкг/мышь, образцы плазмы брали через 48 ч после ГДИ. Активность циркулирующего гетеродимера Ф VIIIIFc/D'D3 анализировали при помощи хромогенного анализа Ф VIII.

Результаты исследований показаны на фиг. 13. Через 48 ч после ГДИ наблюдали одинаковый уровень экспрессии, достигаемый Ф VIII-064 и Ф VIII-159, что указывает на то, что 20 аа линкер и 35 аа линкер обеспечивают одинаковый уровень взаимодействия Ф VIII/D'D3. С другой стороны, Ф VIII-160 продемонстрировал значительно более высокую экспрессию, чем Ф VIII-064, что указывает на то, что 48 аа линкер обеспечивает возможность лучшего связывания Ф VIII/D'D3 по сравнению с 20 аа и 35 аа линкерами.

Оптимальный линкер между фрагментом ФВ и Fc-областью является одним из ключевых элементов в гетеродимере Ф VIIIIFc/ФВ. Нахождение лучшего линкера позволит получить оптимальное взаимодействие между Ф VIII и фрагментом ФВ, предотвратит связывание Ф VIII с эндогенным ФВ, даст возможность Ф VIII избежать процесса выведения ФВ и продлит время полужизни Ф VIII за пределы времени полужизни плазменного ФВ.

Таблица 13

Различные линкеры между D'D3 и фрагментом Fc

Конструкция ДНК	Линкер между D'D3 и Fc
FVIII-064 (SEQ ID NO: 92)	20 aa= I D G G G G S G G G G S L V P R G S G G
FVIII-159 (SEQ ID NO: 93)	35 aa= I S G G G G S G G G S G G G S G G G S L V P R G S G G
FVIII-160 (SEQ ID NO: 94)	48 aa = I S G G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S L V P R G S G G G S G G G S G G G S

Пример 13. Стабильность одноцепочечного Ф VIII.

Одноцепочечный белок Ф VIII должен быть более стабильным, чем его изоформа с двойной цепью. Для проверки этой гипотезы были созданы две конструкции ДНК: Ф VIII-136 (процессируемый Ф VIIIIFc с доменом D'D3) и Ф VIII-148 (одноцепочечный (ОЦ) Ф VIIIIFc с доменом D'D3, который содержит мутацию R1645A/R1648A, чтобы предотвратить расщепление между тяжелой цепью и легкой цепью Ф VIII).

Обе плазмиды вводили Ф VIII/ФВ ДГН мышам при помощи гидродинамической инъекции. Образцы плазмы брали через 24 и 48 ч после инъекций для того, чтобы измерить уровень экспрессии двух изоформ Ф VIIIIFc/D'D3. Как показано на фиг. 14, для обеих временных точек лучшую экспрессию наблюдали для конструкции ОЦ-Ф VIIIIFc/D'D3 (Ф VIII-148) ($p=0,12$, $p=0,19$), что указывает на то, что одноцепочечный Ф VIII может являться более стабильным или лучше экспрессируемым, чем его двухцепочечная изоформа (Ф VIII-136). ФК профиль двух изоформ Ф VIII и уровни их экспрессии в клеточной культуре будут дополнительно исследованы. Одноцепочечную изоформу Ф VIII потенциально можно использовать для замещения традиционной двухцепочечной изоформы для достижения лучшей выработки белка и лучшего *in vivo* времени полужизни Ф VIII.

Пример 14. ПЭГилирование.

Одну или более молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) можно присоединить к любой области белка Ф VIII, фрагмента ФВ или их обоим. Так как согласно данным по кристаллической структуре Ф VIII не содержит на своей поверхности свободного цистеина (PDB:2R7E, Shen et al., Blood 111:1240 (2008); PDB:3CDZ, Ngo, Structure, 16:597-606 (2008)), одним из подходов является либо вставка цистеин-содержащего пептида (например, GGGSGCGGGGS) (SEQ ID NO: 107), либо его присоединение к белку Ф VIII, фрагменту ФВ или им обоим. Затем молекулы ПЭГ, содержащие малеимид, могут быть специфически коньюгированы с цистеином, внедренным в рекомбинантный белок Ф VIII. Вкратце, рекомбинантный белок Ф VIII, содержащий Cys-вставку, можно сконструировать при помощи стандартной молекулярной технологии, а экспрессируемый в экспрессионной системе млекопитающего рекомбинантный белок Ф VIII (например, в клетках HEK293, CHO, BHK21, PER.C6 и CAP) можно очистить при по-

мощи аффинной и ионообменной хроматографии. Очищенный рекомбинантный белок Ф VIII восстанавливают Трис-(2-карбоксиэтил)фосфином (ТКЭФ) для того, чтобы открыть тиоловую группу внедренного цистеина, а затем проводят реакцию с содержащим малеимид ПЭГ. Полученный рекомбинантный белок Ф VIII исследуют на предмет прокоагулирующей активности и продления времени полужизни.

ПЭГ присоединяют в одной из позиций, раскрытых в патентной заявке US № 61670,553, которая в полном объеме включена в данный текст посредством ссылки, либо в других подходящих для вставки позициях. Активность циркулирующего гетеродимера Ф VIII-активность ПЭГилированного рекомбинантного белка Ф VIII анализировали при помощи хромогенного анализа Ф VIII. ФК ПЭГилированного рекомбинантного белка Ф VIII анализировали для мышей с гемофилией А и Ф VIII-ФВ ДГН мышей как описано выше.

Пример 15. Стабильность Ф VIII в плазме крови мышей с гемофилией А и мышей с двойным Ф VIII/ФВ генным нокаутом (ДГН).

Плазменную стабильность разных слитых белков Ф VIIIIFc исследовали в плазме крови мышей с гемофилией А и мышей с двойным Ф VIII/ФВ генным нокаутом (ДГН). Для анализа стабильности 5 МЕ/мл разных белков Ф VIIIIFc инкубировали вместе с плазмой крови мышей с гемофилией А или ДГН мышей при 37°C. Аликвоты брали для разных временных точек, чтобы измерить активность при помощи хромогенного анализа Ф VIII. Активность для каждой временной точки измеряли дважды, а среднюю активность наносили на график как функцию времени.

Для анализа иммунопреципитации Ф VIIIIFc 5 мкг Ф VIIIIFc инкубировали с 250 мкл ФСБ или плазмой крови ДГН мыши на протяжении 24 ч при 37°C. Ф VIIIIFc иммунопреципитировали путем добавления 5 мкг овечьего поликлонального антитела к Ф VIII (ab61370) на протяжении 1 ч при комнатной температуре и 100 мкл гранул протеина А. После 4×1 мл ФСБ отмылок гранулы пересуспендировали в 50 мл 1× восстановительного ДСН-ПААГ буфера. После кипячения 20 мкл (т.е. ~ 1 мкг Ф VIIIIFc) загружали в 4-15% не содержащий красителей Bio-Rad гель. Гель визуализировали при помощи установки Bio-Rad и после этого проводили вестерн-блоттинг с антителом к тяжелой цепи Ф VIII (GMA012).

Активность Ф VIIIIFc (двуцепочечной молекулы Ф VIII, которая содержит отдельные тяжелую и легкую цепи Ф VIII, удерживающиеся посредством нековалентных взаимодействий) уменьшается со временем в плазме крови как мышей с гемофилией А, так и ДГН мышей (фиг. 18А). Из-за отсутствия опосредованной ФВ защиты уменьшение активности Ф VIIIIFc более четко выражено в плазме крови ДГН мышей. Это уменьшение активности Ф VIII происходит, главным образом, из-за диссоциации или деградации тяжелой цепи (ТЦ) Ф VIII. После 24-часовой инкубации в плазме крови ДГН мышей наблюдали около 75% уменьшение тяжелой цепи Ф VIIIIFc (фиг. 18Б). Для легкой цепи (ЛЦ) (данные не приведены) или непропрессированного/одноцепочечного Ф VIIIIFc (т.е. молекулы Ф VIII, в которой легкая цепь и тяжелая цепь удерживаются вместе посредством ковалентной связи - верхняя полоса в гель-изображении) не наблюдали значительного уменьшения (фиг. 18Б).

Так как предполагается, что ФВ повышает стабильность Ф VIII *in vivo*, проводили исследования, чтобы выяснить, будет ли химерный белок гетеродимера Ф VIII-ФВ (Ф VIII155:ФВ31, который содержит D'D3 ФВ, ковалентно присоединенный к Ф VIII через Fc) более стабильным в плазме крови мышей с гемофилией А и ДГН мышей. Согласно приведенным на фиг. 19 данным по плазменной стабильности, наличие D'D3 повышает стабильность Ф VIIIIFc в плазме крови как мышей с гемофилией А, так и ДГН мышей. Одноцепочечный Ф VIIIIFc без D'D3 использовали в этих экспериментах в качестве контроля (оцФ VIII). Согласно фиг. 19, одноцепочечный Ф VIII оказался более стабильным, чем двухцепочечный Ф VII-IFc; при этом наличие D'D3 значительно повышает плазменную стабильность одноцепочечной молекулы Ф VIIIIFc. На основе этого можно предположить, что D'D3 стабилизирует Ф VIII не только путем удержания вместе тяжелой и легкой цепей, но также при помощи других неизвестных механизмов.

Пример 16. Применение фурина/PACE для процессинга ФВ.

ФВ является уникальным белком в том смысле, что он содержит очень большой пропептид (т.е. домен D1D2 ФВ, ~85 кДа). Пропептид ФВ исполняет роль внутреннего шаперона для правильного фолдинга молекулы ФВ. Два фермента - PC5 и фурин (PACE) исследовали на предмет процессинга ФВ. Конструкций ФВ-031 (D1D2D'D3Fc) временно трансфицировали клетки HEK293 у применения различных концентраций PC5 или PACE. Через четыре дня культуральную тканевую среду собирали и подвергали понижению протеина А. Даже при более низкой концентрации (2,5%) фурина (PACE) был более эффективным, чем 10% PC5, в удалении пропептида (D1D2) из D'D3Fc (фиг. 20). Удаление D1D2 является важным, так как известно, что D1D2 приводит к предотвращению взаимодействия D'D3 с Ф VIII.

Пример 17. Фрагмент ФВ в гетеродимере Ф VIII-ФВ предотвращает взаимодействие Ф VIII с полноразмерным ФВ.

Для исследования связывания гетеродимерной конструкции Ф VIII-155/ФВ-31 с полноразмерным ФВ использовали октетную установку ForteBio (фиг. 21А). Для проведения анализа связывания полноразмерный ФВ иммобилизовали при помощи АФС-сенсора, после чего блокировали 1% БСА. После блокирования исследовали различные конструкции Ф VIII на предмет связывания с ФВ. Как и предполагалось, Ф VIII дикого типа и Ф VIIIIFc прочно связываются с сенсорами ФВ. Ф VIII-мутант Y1680F, для

которого, как известно, характерна низкая аффинность или отсутствие аффинности к ФВ, демонстрировал в значительной степени сниженное связывание ФВ. Гетеродимер Ф VIII-155/ФВ-31 вообще не связывался с полноразмерным ФВ, что подтверждает экранирование Ф VIII D'D3 в гетеродимере Ф VIII-ФВ.

Тот же самый эксперимент проводили наоборот, чтобы определить, может ли часть D'D3 гетеродимера Ф VIII-ФВ взаимодействовать с другими молекулами Ф VIII, которые не являются ковалентно присоединенными к D'D3. Как показано на фиг. 21Б, конструкция ФВ-31 (D'D3Fc), иммобилизованная на сенсоре из протеина G, сама может прочно связываться с Ф VIII, при этом D'D3 в гетеродимере Ф VIII-155:ФВ31 не проявляет связывания с Ф VIII. Протеин G вместе с Ф VIII использовали в качестве контроля. Эти эксперименты по связыванию подтвердили, что D'D3 в гетеродимере может взаимодействовать только с молекулой Ф VIII, которая ковалентно присоединена к нему, и предотвращать взаимодействие Ф VIII с полноразмерными молекулами ФВ дикого типа.

Для определения точного значения аффинности связывания D'D3 ФВ с молекулой Ф VIII для ФВ-031 проводили эксперимент по поверхностному плазмонному резонансу (фиг. 22). Конструкцию ФВ-031 (D'D3Fc) иммобилизовали при помощи анти-человеческого IgG, а Ф VIII с удаленным В-доменом проводили через чип, содержащий D'D3Fc. Для Ф VIII наблюдали K_D , составляющую около 10 нМ. Такая аффинность приблизительно в 25 раз ниже по сравнению молекулой ФВ дикого типа и соответствует той величине, о которой ранее сообщалось в литературе.

Пример 18. Влияние разной длины линкеров между D'D3 и Fc на активность и ФК гетеродимера.

Чтобы проверить, оказывает ли влияние на ФК и активность гетеродимера Ф VIII-ФВ изменение длины тромбин-отщепляемого линкера между D'D3 и Fc, разные конструкции ФВ экспрессировали совместно с Ф VIII-155. Исследовали конструкции линкеров трех разных длин, перечисленных в табл. 14А (ФВ-031, ФВ-035 и ФВ-036). Каждую плазмиду смешивали с плазмидой Ф VIII-155 (пример 5) и трансфирировали клетки HEK293. На четвертый день после трансфекции культуральную клеточную среду собирали и концентрировали до 10 МЕ/мл хромогенной активности Ф VIII.

Затем концентрированную клеточную среду вводили 8-12-недельным Ф VIII/ФВ ДГН мышам в дозировке 100 МЕ/10 мл/кг. Образцы плазмы крови брали через 5 мин, 8 ч, 16 ч, 24 ч, 32 ч и 48 ч после дозирования. Ф VIII-активность образцов плазмы анализировали при помощи хромогенного анализа Ф VIII, а время полужизни рассчитывали при помощи программы WinNonlin-Phoenix.

Как показано на фиг. 23, когда длину линкера между D'D3 и Fc-фрагментом увеличили от 48 ак до 73 ак или 98 ак, время полужизни соответствующего гетеродимера Ф VIIIIFc/ФВ увеличилось и достигло 12,2 ч и 13,3 ч соответственно. Это отвечает от 1,5-1,6-кратному увеличению по сравнению с вариантом длиной в 48 ак. На сегодняшний день 98 ак линкер является наиболее оптимальным линкером при использовании Ф VIII-защитной активности фрагмента D'D3, и именно его включают в состав гетеродимера Ф VIIIIFc/ФВ для дополнительного увеличения его времени полужизни.

Для сравнения влияния линкера на активность Ф VIII проводили хромогенный анализ Ф VIII и АЧТВ-анализ культуральной тканевой среды из клеток, экспрессирующих разные гетеродимеры Ф VIII-ФВ. Хотя для гетеродимерных конструкций АЧТВ-активность оказалась в 2 раза меньшей по сравнению с хромогенной активностью, не наблюдали значительных различий между разными линкерами, за исключением случая, когда линкер содержит сайт PAR1 рядом с сайтом тромбина (табл. 14Б).

Таблица 14А

Последовательность разных линкеров между D'D3 ФВ и Fc

Таблица 14Б

Активность гетеродимеров, содержащих линкеры разной длины

ID образца	Описание образца	Длина линкера между D'D3 и Fc (ак)	Хромогенный ME/мЛ	АЧТВ ME/мЛ	Хромогенный/АЧТВ
1	FVIII Fc 155+VWF15	20	1,81	0,85	2,14
2	FVIII Fc 155+VWF31	48	2,32	1,05	2,21
3	FVIII Fc 155+VWF33	35	2,21	1,02	2,16
4	FVIII Fc 155+VWF35	73	2,65	1,24	2,14
5	FVIII Fc 155+VWF36	98	2,75	1,11	2,47
6	FVIII Fc 155+VWF39 (тромбин+PAR1)	26	1,85	1,21	1,53

Пример 19. Связывание Ф VIII с фрагментом ФВ при помощи фермента сортазы.

В другом аспекте реализации изобретения фрагмент ФВ (например, домен D1D2D'D3 или D'D3) присоединяют к Ф VIII при помощи опосредованного сортазой метода *in vitro* белкового лигирования. В одном примере распознающий сортазу А (LPXTG) мотив *Staphylococcus aureus* вносили в С-конец фрагмента ФВ, а остаток Gly(n) - в N-конец Ф VIII (где количество остатков глицина может меняться). Применяемая молекула Ф VIII может являться как одноцепочечной, так и двухцепочечной. Катализированная сортазой реакция транспептидации ковалентно присоединяет фрагмент ФВ к Ф VIII. Обратную ориентацию распознающего мотива также можно применять для того, чтобы связать эти два белка, при этом Ф VIII будет находиться на N-конце с мотивом LPXTG, а фрагмент ФВ - на С-конце с Gly(n) (см. фиг. 24 пример сортазного лигирования для ссылки). Мотив LPXTG и остатки глицина можно заменить другими распознающими сортазу последовательностями.

Также создали фрагмент ФВ, содержащий распознающую сортазу А последовательность слитого Fc-белка. Для конструкций слияния Fc, D1D2D'D3-фрагмент ФВ шивали с Fc-областью IgG посредством GS-линкера, который содержит распознающую сортазу последовательность и сайт расщепления тромбином (табл. 15 и 16). После того как белок экспрессируют и очищают на протеин А-колонке, Fc-область можно отделить при помощи расщепления тромбином. Полученный фрагмент ФВ с распознающим сортазу участком можно затем использовать для лигирования с молекулой Ф VIII (фиг. 24 пример сортазного лигирования для ссылки - ряд Д).

pSYN-ФВ-051 содержит 54-аминокислотный линкер с сортазным и тромбиновым сайтами между фрагментом ФВ и Fc-областью. Проводили синтез фрагмента ДНК, кодирующего 54-аминокислотный линкер

(ISGGGGSGGG

GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLPETGALR PRVVGGGGSG GGGS) (SEQ ID NO: 98) и

часть Fc-области (Genewiz - последовательность №-10-210746313, показана ниже). Фрагмент конструкции Genewiz субклонировали в расщепляемый EcoRV/RsRII pSYN-ФВ-031.

Genewiz - последовательность №-10-210746313 (SEQ ID NO: 99)

AGGAGGCCGATATCTGGCGGGTGGAGGTCCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCTTACCTGAACTGGAGCCCTGCGGCCCG
GTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCTTACCTGAACTGGAGCCCTGCGGCCCG
GGGTCGTCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCCAG
CTCCAGAACCTCTGGCGGACCGTCAGTCTT

Последовательность одноцепочечного Ф VIII, содержащего N-концевой пентаглицин, приведена в табл. 17 и 18.

Таблица 15

Нуклеотидная последовательность pSYN-ФВ-051 (D1D2D'D3Fc ФВ с распознающим сортазу А мотивом и тромбин-отщепляемым линкером между фрагментом ФВ и Fc) (SEQ ID NO: 100)

1 ATGATTCCCTGCCAGATTGCGGGGGTGCCTGCTTGCCTCTGGCCCTCATTTT
51 GCCAGGGACCCCTTGTGCAGAAGGAACTCGCAGGGTCATCCACGGCCC
101 GATGCAGCCTTTCCGGAAGTGACTTCGTCAACACCTTGATGGGAGCATG
151 TACAGCTTGCAGGATACTGCAGTTACCTCCTGGCAGGGGGCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTCTGATTATTGGGGACTTCCAGAATGGCAAGAGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTATCTGGGGATTTCGACATCCATTGTTGTCAATGGT
301 ACCGTGACACAGGGGGACAAAGAGTCTCCATGCCCTATGCCCTCAAAGG
351 GCTGTATCTAGAAACTGAGGTGGGTACTACAAGCTGTCCGGTGAGGCCT
401 ATGGCTTGTGGCCAGGATCGATGGCAGCGGCAACTTCAAGTCTGCTG
451 TCAGACAGATACTCAACAAGACCTGCGGGCTGTGTGGCAACTTAAACAT

501 CTTTGCTGAAGATGACTTTATGACCCAAGAAGGGACCTTGACCTCGGACC
 551 CTTATGACTTTGCCAACTCATGGGCTCTGAGCAGTGGAGAACAGTGGTGT
 601 GAACGGGCATCTCTCCCAGCAGCTCATGCAACATCTCCTGGGGAAAT
 651 GCAGAAGGGCCTGTGGGAGCAGTGCCAGCTCTGAAGAGCACCTCGGTGT
 701 TTGCCCGCTGCCACCCCTCTGGTGGACCCCGAGCCTTTGTGGCCCTGTGT
 751 GAGAAGACTTGTGTGAGTGTGCTGGGGCTGGAGTGCGCCTGCCCTGC
 801 CCTCCTGGAGTACGCCCGACCTGTGCCCAGGAGGAAATGGTGTGTACG
 851 GCTGGACCGACCACAGCGCGTGCAGCCCAGTGTGCCCTGCTGGTATGGAG
 901 TATAGGCAGTGTGTGCCCCCTGCGCCAGGACCTGCCAGAGCCTGCACAT
 951 CAATGAAATGTGTCAGGAGCGATGCGTGGATGGCTGCAGCTGCCCTGAGG
 1001 GACAGCTCCTGGATGAAGGCCTCTGCGTGGAGAGCACCGAGTGTCCCTGC
 1051 GTGCATTCCGAAAGCGCTACCCTCCCGCACCTCCCTCTCGAGACTG
 1101 CAACACCTGCATTGCCGAAACAGCCAGTGGATCTGCAGCAATGAAGAAT
 1151 GTCCAGGGAGTGCCTTGTCACTGGTCAATCCCACCTCAAGAGCTTGAC
 1201 AACAGATACTTCACCTTCACTGGGATCTGCCAGTACCTGCTGGCCCGGGA
 1251 TTGCCAGGACCACCTCCTCTCCATTGTCAATTGAGACTGTCCAGTGTGCTG
 1301 ATGACCGCGACGTGTGTCACCCGCTCCGTACCGTCCGGCTGCCCTGGC
 1351 CTGCACAAACAGCCTGTGAAACTGAAGCATGGGGCAGGAGTTGCCATGGA
 1401 TGGCCAGGACATCAGCTCCCCTCTGAAAGGTGACCTCCGCATCCAGC
 1451 ATACAGTGACGGCTCCGTGCGCCTCAGCTACGGGGAGGACCTGCAGATG
 1501 GACTGGGATGGCCCGGGAGGCTGCTGGTGAAGCTGTCCCCCGTCTATGC
 1551 CGGGAAAGACCTGGGGCTGTGGGAATTACAATGGCAACCAGGGCGACG
 1601 ACTTCCTTACCCCCCTCTGGGCTGGCGGAGCCCCGGGTGGAGGACTTCGGG
 1651 AACGCCCTGGAAGCTGCACGGGACTGCCAGGACCTGCAGAACAGCACAG
 1701 CGATCCCTGCGCCCTCAACCCCGCGATGACCAGTTCTCGAGGAGGCGT
 1751 GCGCAGGCTCTGACGTCCCCCACATTGAGGCTGCCATCGTGGCGTCAGC
 1801 CCGCTGCCCTACCTGCGGAACCTGCCGCTACGACGTGTGCTCTGCTCGGA
 1851 CGGCCGCGAGTGCCTGTGCGCGCCCTGGCCAGCTATGCCGCGGCTGCG
 1901 CGGGGAGAGGCGTGCCTGTGCGCGTGGCGAGCCAGGCCAGGCGCTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCGAAAGGCCAGGTGTACCTGCACTGCGGGACCCCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCGCTCTCTCTTACCCGGATGAGGAATGCAATGAGGCGCTGCC
 2051 TGGAGGGCTCTCTGCCCTCAGGCTCTACATGGATGAGAGGGGGGAC
 2101 TGCCTGCCAAGGCCAGTGCCCTGTACTATGACGGTGAGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAAGACATCTCTCAGACCATCACACCATGTGCTACTGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCACTGTACCATGAGTGGAGTCCCCGGAAGCTTGCTGCCGTGAC
 2251 GCTGTCCCTCAGCAGTCCCCGTCTCATCGCAGCAAAGGAGCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCTGGATGGTCAAGCTGGTGTGCCCTGACAACCTGCCGGCTG
 2351 AAGGGCTGAGTGTACAAAACGTGCCAGAACTATGACCTGGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCTGTGCTCTGGCTGCCCTGCCCTGGGAGTGGTCCATCAGGGCA
 2451 TGAGAACAGATGTGTGGCCCTGGAAAGGTGTCCCTGCTTCCATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGCCCTGGAGAACAGTGAAGATTGGCTGCAACACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACCGGAAGTGGAACTGCAAGACCATGTGTGTGATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATGGCATGCCCACTACCTCACCTCGACGGCTCAAATACC
 2651 TGTTCCCCGGGAGTGCCAGTACGTTCTGGTGCAGGATTACTGCCAGT
 2701 AACCCCTGGACCTTCGGATCCTAGTGGGAATAAGGGATGCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAATGCAAGAAACGGGTCAACCATCCTGGTGGAGGGAGGAGA
 2801 TTGAGCTTTGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCCATGAAGGATGAG
 2851 ACTCACCTTGAGGTGGTGGAGTCTGCCGGTACATCATTCTGCTGCTGGG
 2901 CAAAGCCCTCTCGTGGTCTGGACCCGCCACCTGAGCATCTCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGACATACCAAGGAGAAAGTGTGTGGCTGTGGGAATTGAT
 3001 GGCATCCAGAACATGACCTCACCAGCAGCAACCTCCAAGTGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGACTTGGAACTCCTGGAAAGTGAGCTCGAGTGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGTGCCTCTGGACTCATCCCCGCCACCTGCCATAACACATC
 3151 ATGAAGCAGACGATGGTGGATTCTCTGTAGAATCCTTACCAAGTGCAGT
 3201 CTTCCAGGACTGCAACAAAGCTGGTGGACCCCGAGCCATATCTGGATGTCT
 3251 GCATTACGACACCTGCTCTGTGAGTCCATTGGGACTGCCCGCATTC
 3301 TGCAGACCATGGTGTGCTATGCCACGTGTGCCCCAGCATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGGAGGGACGCCACATTGTGCCCTCAGAGCTGCGAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGAGAACGGGTATGAGGCTGAGTGGCGTATAACAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCGTCAAGTCAGTGTGCAAGCAGGCCACTGCCCTCAGGGAAATCCTGG
 3501 GCAGTGTGTGGAGGGCTGCCATGCCACTGCCCTCAGGGAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTGCAAGACCTGCCGTGACCTGAAGACTGTCCAGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCCGGCGTTTGCCCTCAGGAAAGAAAGTCACCTTGAATCCCAG
 3651 TGACCCCTGAGCAGTGCCTGCCAGATTGTGATGTTGTCAACCTCACCT

3701 GTGAAGCCTGCCAGGAGCCGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGG
 3751 GGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGGATC
 3801 CGGTGGCGGGGGATCCTTACCTGAAACTGGAGCCCTGCGGCCCGGGGTGCG
 3851 TCGCGGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGACAAACTCACACATGC
 3901 CCACCGTGCCTCAGCTCCAGAACTCCTGGCGGACCGTCAGTCTTCCCTTT
 3951 CCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCA
 4001 CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTAAC
 4051 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGA
 4101 GGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGTCCTGC
 4151 ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAA
 4201 GCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCC
 4251 CCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCA
 4301 AGAACCAAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 4351 ATCGCGTGGAGTGGAGAGACAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
 4401 CACGCCTCCCCTGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTACAGCAAGC
 4451 TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCC
 4501 GTGATGCATGAGGCCTCTGCACAACACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
 4551 GTCTCCGGTAAATGA

Таблица 16

Белковая последовательность ФВ-051 ((D1D2D'D3Fc ФВ с распознающим сортазу А мотивом и тромбин-отщепляемым линкером между фрагментом ФВ и Fc; сайт сортазы А выделен жирным)
(SEQ ID NO: 101)

1 MI PARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRRSSTARCSLFGSDFVNNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSGEQWC
 201 ERASPPSSCNISSEGMQKGLWEQCOLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALC
 251 EKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSACSPVCAGME
 301 YRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTCPC
 351 VHSGKRYPPGTSLSRDCNTCIRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGICQYLLARDQDHFSFSIVIETVQCADRDAVCTRSVTVRP
 451 LHNSLVKLKHGAGVAMDQD1QLPLLGKDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLVVLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQDLQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLSPTEACHRAVS
 601 PLPYLRLNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAACAGRGVRVAREPGRCEL
 651 NCPKGQVYLQCGTPCNLTCRSLSYPDEECNEACLEGFCPPGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHRSKRSLSCRPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLCPCPGMVRHENRCVALERCPCFHQGKEYAPGETVKIGCNT
 851 CRDRKWNCNDHVCATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGEQYVVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVGNKGCSHPVKCKRVTILVEGGEIELFDGEVNVKRP
 951 THFEVVESGRYIILLLGKALSVWDRHLSISVVLKQTYQEKC
 1001 GIVNNDLTSSNLOVEDPVDFGN
 1051 MKQTMVDSSCRILTSDFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHVCAQHGKVWTWRATLCPQSC
 1151 PACQVTCQHPEPLACPVQC
 1201 VAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDV
 1251 GS
 1301 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 1351 WYDGV
 1401 ALPAPIEKTISKAKGQPREP
 1451 IAVEWE
 1501 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Таблица 17

Нуклеотидная последовательность Ф VIII-265 (одноцепочечной молекулы Ф VIII с пентаглицином на N-конце) (SEQ ID NO: 102)

1 ATGCAAATAGAGCTCTCACCTGCTTCTGTGCCTTTGCGATTCTG
 51 CTTTAGTGGAGGAGGAGGAGGCCACAGAGATACTACCTGGGTGCAG
 101 TGGAACGTGTCATGGACTATATGCCAAGTGTATCTCGGTGAGCTGCCTGTG
 151 GACGCAAGATTTCTCCTAGAGTGC
 201 AGTCGTGTACAAAAGACTCTGTTGTAGAATT
 CACGGATCACCTTTCA

251 ACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCTTACCATC
 301 CAGGCTGAGGTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTC
 351 CCATCCTGTCAGTCCTCATGCTGGTATCCTACTGGAAAGCTTCTG
 401 AGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGAT
 451 AAAGTCTCCCTGGAGGCCATACATATGTCAGGTCTGAAAGA
 501 GAATGGTCCAATGCCCTGACCCACTGTGCTTACACTCATATCTT
 551 CTCATGTGGACCTGGTAAAGACTTGAATTGAGGCCCTATTGGAGGCCCTA
 601 CTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCAAGGAAAGACACAGACCTTGCA
 651 CAAATTATACTACTTTGCTGTATTGATGAAGGGAAAAGTTGGCACT
 701 CAGAAACAAAGAACCTCTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCG
 751 GCCTGCCCTAAATGCACACAGTCATGGTTATGTAACAGGTCTCTGCC
 801 AGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTTGATTGGAA
 851 TGGGCACCACTCTGAAGTGCACTCAATATTCTCGAAGGTACACATT
 901 CTTGTGAGGAACCATGCCAGGCGCCTGGAAATCTGCCAATAACTTT
 951 CCTTACTGCTCAAACACTCTGATGGACCTTGGACAGTTCTACTGTTT
 1001 GTCATATCTCTCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTA
 1051 GACAGCTGTCCAGAGGAACCCAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAC
 1101 GGAAGACTATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTTGAGGT
 1151 TTGATGATGACAACCTCTCCTTATCCAATTGCTCAGTTGCCAAG
 1201 AAGCATCCTAAACACTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGGAGGACTG
 1251 GGACTATGCTCCCTAGTCCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAGTC
 1301 AATATTGAAACAATGGCCCTAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTC
 1351 CGATTATGGCATACACAGATGAAACCTTAAGACTCGTGAAGCTATTCA
 1401 GCATGAATCAGGAATCTGGACCTTACTTTATGGGAAGTGGAGACA
 1451 CACTGTTGATTATTTAAGAATCAAGGAAGCAGACCATATAACATCTAC
 1501 CCTCACGGAATCACTGATGTCGCTTGTATTCAAGGAGATTACCAA
 1551 AGGTGTAACATTGAAGGATTTCATTCTGCAGGAGAAATATTCA
 1601 AATATAATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGCCAACTAATCAGATCCT
 1651 CGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTGTTAATATGGAGAGATCT
 1701 AGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTA
 1751 ATCAAAGAGGAACCAAGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTT
 1801 TCTGTATTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAAC
 1851 CTTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTCAGCTGAGGATCCAGAGTTCCAAG
 1901 CCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTGATAGTTGCAG
 1951 TTGTCAGTTGTTGATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGG
 2001 AGCACAGACTGACTCCCTCTGTCTTCTCTGGATATACTTCAAAC
 2051 AAAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCATTCCCATTCTCAGGAGAA
 2101 ACTGTCCTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGTC
 2151 CAACTCAGACTTCGGAACAGAGGCATGACGCCCTACTGAAGGTTCTA
 2201 GTTGTGACAAGAACACTGGTATTACAGAGGACAGTTGAAGATATT
 2251 TCAGCATACTGCTGAGTAAAAACATGCCATTGAACCAAGAACGTTCTC
 2301 TCAAAACCCACCAGTCTGAAGGCCATCAGGCCAAATAACTCGTACTA
 2351 CTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAATTGACTATGATGATGACCATATCAGTT
 2401 GAAATGAAGAAGGAAGATTGACATTATGATGAGGATGAAAATCAGAG
 2451 CCCCCCGAGCTTCAAAAGAAAACACGACACTATTGCTGCAGTGG
 2501 AGAGGCTCTGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCCATGTTCTAAGAAAC
 2551 AGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTCCAGGA
 2601 ATTTACTGATGGCTCTTACTCACGCCATTACCGTGGAGAACTAAATG
 2651 AACATTGGCCTCTCGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGAAGATAAT
 2701 ATCATGGTAACTTCAGAAATCAGGCCCTCGTCCCTATTCTTCTATT
 2751 TAGCCTTATTCTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAA
 2801 AAAACTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAAACTTACTTTGAAAGTGAA
 2851 CATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTA
 2901 TTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAGATGTCAGTCAAGGCCCTGATTGGAC
 2951 CCCTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCGCTCATGGGAGACAA
 3001 GTGACAGTACAGGAATTGCTCTGTTTACCATCTTGATGAGACCAA
 3051 AAGCTGGTACTTCAGTAAAATATGAAAGAAAATGCAAGGGCTCCCTGCA
 3101 ATATCCAGATGGAGATCCCACTTAAAGAGAATTATGCTCCATGCA
 3151 ATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGA
 3201 TCAAAGGATTGATGGTATCTGTCAGCATGGCAGCAATGAAAACATCC
 3251 ATTCTATTCTTCAGTGGACATGTGTCAGTGTACGAAAAAAAGAGGAG
 3301 TATAAAATGGCACTGTACAATCTATCCAGGTGTTTGAGACAGTGG
 3351 AATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTGGCGGGTGGAAATGCCTATTGGCG
 3401 AGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTCTGGTGTACAGCAATAAG

3451 TGTCAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTAGAT
3501 TACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGCCCCAAAGCTGCCAGACTTC
3551 ATTATTCCGGATCAATCAATGCCCTGGAGCACCAAGGAGGCCCTTTCTGG
3601 ATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTACCGCATCAAGACCCA
3651 GGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCAGTTTATCATCA
3701 TGTATAGTCTTGATGGAAAGAAGTGGCAGACTTATCAGGAAATTCCACT
3751 GGAACCTTAATGGTCTTCTTGGCAATGTGGATTCATCTGGATAAAACAA
3801 CAATATTTTAACCCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTGCCACCCAA
3851 CTCATTATAGCATTGCAGCAGCTTCGCATGGAGTTGATGGCTGTGAT
3901 TTAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGAAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGA
3951 TGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTGCCACCTGGT
4001 CTCCCTCAAAAGCTGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCTGGAGA
4051 CCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAACAGC
4101 AATGAAAGTCACAGGAGTAACACTCAGGGAGTAAATCTCTGCTTACCA
4151 GCATGTATGTGAAGGAGTTCCATCTCCAGCAGTCAGATGCCATCAG
4201 TGGACTCTTTTCTTCAAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTCAGGGAAATCA
4251 AGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACCTCTAGACCCACCGTTACTGACTC
4301 GCTACCTTCGAATTCAACCCCAAGAGTGGTGCACCCAGATTGCCCTGAGG
4351 ATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGA

Таблица 18

Белковая последовательность Ф VIII-265 (одноцепочечной молекулы Ф VIII с пентаглицином на N-конце: пентаглицин выделен жирным) (SEQ ID NO: 103)

Пример 20. Плазменная стабильность и ФК Ф VIII-198 в плазме крови мышей с гемофилией А и мышей с двойным Ф VIII/ФВ генным нокаутом (ДГН).

Плазменную стабильность Ф VIII-198 (которая является одноцепочечной Ф VIIIIFc-226N6-молекулой, частично содержащей В-домен; где 226 представляет 226 N-концевых аминокислот В-домена Ф VIII, а N6 представляет шесть участков N-гликозилирования в В-домене) сравнивали с Ф VIIIIFc (Ф VIII 155/Fc) в плазме крови мышей с двойным Ф VIII/ФВ генным нокаутом (ДГН). Схематическое изображение Ф VIII-155 и Ф VIII-198 представлено на фиг. 25.

Для анализа стабильности 5 МЕ/мл белков Ф VIII-198 или Ф VIIIIFc с мышью или ДГН плазмой при 37°C. Аликовты брали для разных временных точек, чтобы измерить активность при помощи хромогенного анализа Ф VIII. Активность для каждой временной точки измеряли дважды, а среднюю активность наносили на график как функцию времени. Анализ стабильности показал, что наличие частичного В-домена повышает стабильность одноцепочечного Ф VIIIIFc (фиг. 26А).

Время полужизни Ф VIII-198 (одноцепочечная B226N6) также сравнивали с Ф VIII-155 (одноцепочечный Ф VIII с удаленным В-доменом) для ДГН мышей. Ф VIII-198 имеет по меньшей мере приблизительно в 1,5 раз большее время полужизни по сравнению с Ф VIII-155 (фиг. 26Б). Эти эксперименты позволяют предположить, что возможно существование взаимосвязи между стабильностью Ф VIII и его *in vivo* временем полужизни.

Нуклеотидная последовательность белка Ф VIII-198 (Ф VIIIIFc с частичным В-доменом 226N6) (SEQ ID NO: 104)

1	ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTGTGCCTTTCGCGATTCTG
51	CTTTAGTGCACCAAGAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCTATGGG
101	ACTATATGCAAAGTGTCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTCCT
151	CCTAGAGTGCACAAATCTTTCATTCAACACACCTCAGTCGTGTACAAAAAA
201	GACTCTGTTGTAGAATTACCGGATCACCTTCAACATCGCTAAGCCAA
251	GGCCACCCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCTACCATCCAGGCTGAGGTTAT
301	GATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCATCCTGTCAGTCT
351	TCATGCTGTTGGGTATCCTACTGGAAAGCTCTGAGGGAGCTGAATATG
401	ATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAGATGATAAAGTCTCCCTGGT
451	GGAAGCCATACATATGTCAGGCAGGTCTGAAAGAGAAATGGTCAAATGGC
501	CTCTGACCCACTGTGCCTTAACCTACTCATATCTTCTCATGTTGGACCTGG
551	TAAAAGACTTGAATTCAAGGCCTATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAA
601	GGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCCACAAATTATACTACT
651	TTTTGCTGTATTGATGAAGGGAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAAACT
701	CCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCTAAATG
751	CACACAGTCAATGGTTATGTAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATG
801	CCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGAAATGGCACCACTCCTG
851	AAGTGCACCTCAATATTCCCTGAAGGTACACACATTCTGTGAGGAACCAT
901	CGCCAGGCGTCCTGGAAATCTGCCAATAACTTCTTACTGCTCAAAC
951	ACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTCTACTGTTGTCAATCTCTCCC
1001	ACCAACATGATGGCATGGAAAGCTTATGTCAGTAAAGTAGACAGCTGTCCAGAG
1051	GAACCCAACACTACGAATGAAAATAATGAAGAACGGAAAGACTATGATGA
1101	TGATCTTAATGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTGATGATGACAAC
1151	CTCCTTCTTTATCCAAATTGCGTCAGTTGCCAAGAACGATCCTAAACT
1201	TGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGAGGACTGGACTATGCTCCCTT
1251	AGTCCTCGCCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCATATTGAACAATG
1301	GCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCGATTATGGCATAAC
1351	ACAGATGAAACCTTAAGACTCGTGAAGCTATTGAGCATGAATCAGGAAT
1401	CTTGGGACCTTACTTATGGGAAGTGGAGACACACTGTTGATTATAT
1451	TTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAAACATCTACCCCTCACGGAATCACT
1501	GATGTCGTCCTTGTATTCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAACATT

1551 GAAGGATTTCCAATTCTGCCAGGAGAAAATTCAAATATAATGGACAG
 1601 TGAAGTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGC
 1651 TATTACTCTAGTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCAT
 1701 TGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACC
 1751 AGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTCTGTATTGATGAG
 1801 AACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATAACACGCTTCTCCCCAATCC
 1851 AGCTGGAGTGCAGCTTGAGGAGATCCAGAGTCTCAAGCCTCAACATCATGC
 1901 ACAGCATCAATGGCTATGTTTGATAGTTGCAGTTGTCAAGTTGTTG
 1951 CATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAACGATTGGAGCACAGACTGACTT
 2001 CCTTTCTGTCTTCTCTGGATATACTCAAACACAAAATGGCTATG
 2051 AAGACACACTCACCCATTCCCATTCTCAGGAGAAACTGTCTCATGT
 2101 ATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCACAACTCAGACTTC
 2151 GAACAGAGGCATGACCGCCTACTGAAGGTTCTAGTTGTGACAAGAAC
 2201 CTGGTGATTATTACAGGGACAGTTATGAAGATATTCAAGCATCTTGCTG
 2251 AGTAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTCTCAGAATTCAAGACA
 2301 CCCTAGCACTAGGCAAAGCAATTAAATGCCACCAATTCCAGAAAATG
 2351 ACATAGAGAAGACTGACCCCTGGTTGCACACAGAACACCTATGCCTAA
 2401 ATACAAAATGTCCTCTAGTGAATTGTTGATGCTCTGCGACAGAGTCC
 2451 TACTCCACATGGCTATCCTTATCTGATCTCCAAGAAGCAAATATGAGA
 2501 CTTTTCTGATGATCCATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTG
 2551 TCTGAAATGACACACTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGACATGGT
 2601 ATTTACCCCTGAGTCAGGCCCTCAATTAAAGATTAATGAGAAACTGGGA
 2651 CAACTGCAGCAACAGAGTTGAAGAAACTTGATTCAAAGTTCTAGTACA
 2701 TCAAATAATCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTGGCAGCAGGTAC
 2751 TGATAATAACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTATTGATA
 2801 GTCAATTAGATACCACTCTATTGGCAAAAGTCATCTCCCTTACTGAG
 2851 TCTGGTGGACCTGAGCTGAGTGAAGAAAATAATGATTCAAAGTTGTT
 2901 AGAATCAGGTTAATGAATAGCAAGAAAAGTTCATGGGAAAAATGTAT
 2951 CGTCAGAAATAACTCGTACTACTCTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGAC
 3001 TATGATGATACCATATCAGTGAATGAAGAAGGAAGATTTGACATTAA
 3051 TGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGAGCTTCAAAGAAAACAGCAC
 3101 ACTATTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGATTATGGATGAGTAGC
 3151 TCCCCACATGTTCAAGAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTT
 3201 CAAGAAAGTTGTTCCAGGAATTACTGATGGCTCCTTACTCAGCCCT
 3251 TATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTGGGACTCTGGGGCATATATA
 3301 AGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTCAGAAATCAGGCCTC
 3351 TCGTCCCTATTCTTCTATTCTAGCCTTATTCTATGAGGAAGATCAGA
 3401 GGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTGTCAAGCCTAATGAAACCAA
 3451 ACTTACTTTGGAAAGTGCAACATCATGGCACCCACTAAAGATGAGTT
 3501 TGACTGCAAAGCCTGGCTTATTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATG
 3551 TGCACTCAGGCCCTGATTGGACCCCTCTGGCTGCCACACTAACACACTG
 3601 AACCTGCTCATGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTGCTCTGTTTT
 3651 CACCATTTGATGAGACAAAAGCTGGTACTTCAGTGGAAATGGAAA
 3701 GAAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCACCTTTAAA
 3751 GAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACC
 3801 TGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTGATGGTATCTGCTCAGCA
 3851 TGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTCAATTGAGCTGGACATGTGTT
 3901 ACTGTACGAAAAAAAGAGGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCC
 3951 AGGTGTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCTAACAGCTGGAATTGGC
 4001 GGGTGGAATGCCATTGGCGAGCATCTACATGCTGGATGAGCACACTT
 4051 TTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTCAAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGG
 4101 ACACATTAGAGATTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGG
 4151 CCCCCAAAGCTGCCAGACTTCATTATCCGGATCAATCAATGCCCTGGAGC
 4201 ACCAAGGAGCCCTTTCTGGATCAAGGTGGATCTGTTGCCACCAATGAT
 4251 TATTACGGCATCAAGACCCAGGGTGCCTCGAGAGTTCTCCAGCCTCT
 4301 ACATCTCTCAGTTATCATCATGTATAAGTCTGATGGGAAGAAGTGGCAG
 4351 ACTTATCGAGGAAATTCCACTGGAACCTTAATGGTCTTCTGGCAATGT
 4401 GGATTCACTGGATAAAACACAATTGTTAACCTCCAATTATTGCTC
 4451 GATACATCCGTTGCACCCAACCTATTAGCATTGCGACACTCTTCGC
 4501 ATGGAGTTGATGGCTGTGATTAAATAGTTGAGCAGATTACTGCTTCATC
 4551 GGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTA
 4601 CCAATATGTTGCCACCTGGCTCCTTCAAAGCTGACTTCACCTCCAA
 4651 GGGAGGAGTAATGCCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGC
 4701 GCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGAGTAACACTCAGG

4751 GAGTAAAATCTCTGCTTACCAAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCATCTCC
 4801 AGCAGTCAGATGCCATCAGTGGACTCTCTTTTCAGAATGGCAAAGT
 4851 AAAGGTTTTCAAGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACCTC
 4901 TAGACCACCGTTACTGACTCGCTACCTCGAATTCAACCCAGAGTTGG
 4951 GTGCACAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGCTGCGAGGCACAGGA
 5001 CCTCTACGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCTCCAGAACTCC
 5051 TGGCGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTC
 5101 ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
 5151 CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGC
 5201 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 5251 GTGGTCAGCGTCCTCACCGCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 5301 GTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA
 5351 CCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTG
 5401 CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCCT
 5451 GGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 5501 GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 5551 GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 5601 GCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
 5651 ACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCCTCGGGTAAATGA

Последовательность белка Ф VIII-198 (SEQ ID NO: 105)

1 MQIELSTCFFLCLRFCSATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDFRFP
 51 PRVPKSFPFNTSVYKKTLFVEFTDHLFNIKPRPPWMGLLPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
 151 GSHTYVWQVLKENGPMSADPLCLTYSYLHVLDVLKDLNSGLIALLVCRE
 201 GSLAKEKTQTLHKFILLFAVDEGKSWHSETKNSLMDRDAASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEIGHTFLVRNH
 301 RQASLEIISPITLEAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNEEAEDYDDDLTSEMDVVFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT
 401 WVHYIAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY
 451 TDETFKTRAEIQHESGILGPLLGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDE
 601 NRSWYLTEIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHMKVYEDTLTFPFSGETVFMS
 701 MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGYYEDSYEDI SAYLL
 751 SKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPK
 801 IQNVSSSDLLMLLQSPTHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSL
 851 SEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTATELKLDKFV
 901 SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSPMVHYDSQLDTLFGKKSSPLTE
 951 SGGPLSLSEENNDSKLESGLMNSQESSWGKNVSSEITRTTLQSDQEEID
 1001 YDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAVERLWDYGMSS
 1051 SPHVLRNRAQSGSVPQFKVVFQEFDTGDSFTQPLYRGELNEHLLG
 1101 RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETK
 1151 TYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHNTL
 1201 NPAHGRQVTVQEFALEFTIFDETWSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFK
 1251 ENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFS
 1301 GHVF
 1351 TVRKKEEYKMALNLYPGVFETVEMPLSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTL
 1401 FLVYSNKCQTPLGMASGHIRDQITASGQYQWAPKLARLHSGSINAWS
 1451 TKEPFSWIKV DLLAPMIHGIKTOQARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQ
 1501 TYRGNSTGTLMVFGNVDSGGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLR
 1551 MELMGCDLNCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHQ
 1601 GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDQKTMKVTVTTQGVKSLLTSMYVKEFLIS
 1651 SSQDGHQWTLFQNGKVKVQFQGNQDSFTPVVSNSLDPPLTRYLRIHPQSW
 1701 VHQIALRMEVGLGCEAQDLYDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKD
 1751 TL
 1801 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVNAKTPREEQYNSTYR
 1851 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 1851 REPVYTL
 1851 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 1851 PENNYKTPPPVLDSD
 1851 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Пример 21. Экспрессия белка D1D2 ФВ.

Правильный фолдинг домена D'D3 важен для его связывания с Ф VIII.

Пропептид ФВ (D1D2 - аминокислоты 1-763) необходим для эффективного образования дисульфидной связи и фолдинга D'D3. Он действует как внутренний шаперон для фолдинга D'D3. Конструкции ФВ, создающие фрагменты ФВ, также могут экспрессироваться там, где пропептид ФВ (т.е. домен D1D2) напрямую связан с доменом D'D3, и удаляться во время регулярного внутриклеточного процесинга D'D3 (т.е. в цис-форме), или же он может экспрессироваться с другой плазмиды, т.е. в транс-

форме. Гетеродимер Ф VIII-ФВ был сконструирован таким образом, чтобы D1D2 мог экспрессироваться как в цис-, так и в транс-форме.

Клонирование ФВ-053: клон ФВ-053 экспрессирует пропептид ФВ (домен D1D2) для экспрессии D1D2 в транс-форме. Пропептид ФВ амплифицировали ПЦР из полноразмерной формы при помощи ESC54 и ESC124. ESC54-ФВ прямая с сайтом BsiW1 (SEQ ID NO: 111)

(CGCTTCGCGACGTACGGCCGCCACCATGATTCCGCCAGATTGCCGGGGTGTGCTTGCTC)

ESC124 - D1D2 клонирующий олиго с сайтом Not1 - обратная (SEQ ID NO: 112)

(CTAGACTCGAGCGGCCCTCACCTTTGCTGCGATGAGACAGGGGACTGCTGAGGACAGC)

Продукт ПЦР расщепляли BsiW1 и Not1 лигировали в BsiW1/Not1-расщепленный пЦДНК 4.

Нуклеотидная последовательность ФВ-053 (пропептид D1D2 ФВ) (SEQ ID NO: 113)

1	ATGATTCTGCCAGATTGCCGGGGTGTGCTTGCTCTGGCCCTCATTTT
51	GCCAGGGACCCCTTGTGCAGAAAGGAACTCGCGGCAGGTATCCACGGCCC
101	GATGCAGCCTTTCCGGAAGTGAATTCGTCACACACCTTGATGGGAGCATG
151	TACAGCTTGCAGGATACTGCAGTTACCTCCTGGCAGGGGGCTGCCAGAA
201	ACGCTCCTCTCGATTATTGGGGACTTCCAGAATGGAAGAGAGTGAGCC
251	TCTCCGTATCTGGGAAATTGTTTGACATCCATTGTTGTCAATGGT
301	ACCGTGACACAGGGGGACAAAGAGTCCTCCATGCCCTATGCCTCCAAAGG
351	GCTGTATCTAGAAACTGAGGCTGGTACTACAAGCTGTCCGGTGAGGCCT
401	ATGGCTTGTGCCAGGATCGATGGCAGCGGCAACTTCAAGTCCTGCTG
451	TCAGACAGATACTCAACAAAGACCTGCCGGCTGTGTCAGCAACTTAACAT
501	CTTGCTGAAGATGACTTATGACCAAGAAGGGACCTGACCTCGGACC
551	CTTATGACTTGCCTACTCATGGCTCTGAGCAGTGGAGAACAGTGGTGT
601	GAACGGGCATCTCCTCCAGCAGCTATGCAACATCTCCTGGGAAAT
651	GCAGAAGGGCCTGTGGGAGCAGTGCAGCTCTGAAGAGCACCTCGGTGT
701	TTGCCCGCTGCCACCCCTCTGGTGGACCCCGAGCCTTGTGCCCTGTGT
751	GAGAAGACTTTGTGTGAGTGTGCTGGGGGCTGGAGTGCCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAGTACGCCCGGACCTGTGCCCTGCCAGGAGGGAAATGGTGTGTACG
851	GCTGGACCGACCACAGCGCTGCAGCCCAGTGTGCCCTGCTGGTATGGAG
901	TATAGGCAGTGTGTGCCCCCTGCGCCAGGACCTGCCAGAGCCTGCACAT
951	CAATGAATGTGTCAAGGAGCGATGCGTGGATGGCTGCAGCTGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCTGGATGAAGGCTCTGCGTGGAGAGCACCGAGTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCGAAAGCGCTACCCCTCCCGCACCTCCTCTCGAGACTG
1101	CAACACCTGCATTGCCGAAACAGCCAGTGGATCTGCAGCAATGAAGAAT
1151	GTCCAGGGAGTGCCTTGTCACTGGTCAATCCCACCAAGAGCTTGAC
1201	AACAGATACTTCACCTTCAGTGGATCTGCCAGTACCTGCTGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGACCACCTCTCCATTGTCATTGAGACTGTCCAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGACGCTGTGTCACCCGCTCCGTACCGTCCGGCTGCCCTGG
1351	CTGCACAACAGCCTTGTGAAACTGAAGCATGGGCAGGAGTTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGACATCCAGCTCCCCCTCCTGAAAGGTGACCTCCGCATCCAGC
1451	ATACAGTGAAGGCGCTCCGTGCCCTCAGCTACGGGAGGACCTGCAGATG
1501	GACTGGGATGGCCCGGGAGGCTGCTGGTGAAGCTGTCCCCGTCTATGC
1551	CGGGAAAGACCTGCCGCTGTGTTGGAAATTACAATGGCAACCAGGGCGACG
1601	ACTTCCTTACCCCTCTGGGCTGGCGGAGCCCCGGGTGGAGGACTTCGGG
1651	AAACGCCCTGGAAGCTGCACGGGACTGCCAGGACCTGCAGAACAGCACAG
1701	CGATCCCTGCCCTCAACCCCGCATGACCAGGTTCTCGAGGGAGGCCT
1751	GCGCGTCCCTGACGTCCCCACATTGAGGCTGCCATCGTCCGTCAGC
1801	CCGCTGCCCTACCTGCCGAACCTGCCCTACGACGTGTGCTCTGCTCGGA
1851	CGGCCGCGAGTGCCTGTGCCGCCCTGGCCAGCTATGCCGCCCTGCC
1901	CGGGGAGAGGCGTGCCTGCCGTGGCGAGCCAGGCCGCTGTGAGCTG
1951	AACTGCCCGAAAGGCCAGGTGTACCTGCAGTGCAGGGACCCCCCTGCAACCT
2001	GACCTGCCGCTCTCTTACCCGGATGAGGAATGCAATGAGGCCCTGCC
2051	TGGAGGGCTGCTCTGCCCTCAGGCTCTACATGGATGAGAGGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCAAGGCCAGTGCCCTGTTACTATGACGGTGAGATCTTCCA
2151	GCCAGAAGACATCTCTCAGACCATCACACCATGTGCTACTGTGAGGATG
2201	GCTTCATGCACTGTACCATGAGTGGAGTCCCCGGAGCTGCTGCCTGAC
2251	GCTGCTCTCAGCAGTCCCCGTCTCATCGCAGCAAAGG

Белковая последовательность ФВ-053 (пропептид D1D2 ФВ) (SEQ ID NO: 114)

```

1      MTPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSM
51     YSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNG
101    TVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLL
151    SDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWC
201    ERASPPSSCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALC
251    EKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSACSPVCPAGME
301    YRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTCPC
351    VHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFD
401    NRYFTFSGICQYLLARDCQDHFSIVIETVQCADDRDAVCTRSVTVRPLG
451    LHNSLVKLKHGAGVAMDQDILQPLLKGDRLRIQHTVTASVRLSYGEDLQM
501    DWDGRGRLLVVKLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLAEPRVEDFG
551    NAWKLHGDCQDLQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVS
601    PLPYLNRNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGRVRAWREPGRCEL
651    NCPKGQVYLQCGTPCNLTCSRSLSYDEECNEACLEGFCFCPPGLYMDERGD
701    CVPKAQCPYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPD
751    AVLSSPLSHRSKR

```

Вышеприведенное описание характерных вариантов реализации раскрывает общий характер данного изобретения в настолько полном объеме, что другие специалисты могут, применяя знания в данной области техники, с легкостью модифицировать и/или адаптировать эти характерные варианты реализации для различных применений, без проведения лишних экспериментов и без отступления от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации находятся в пределах содержания и серии эквивалентов раскрытых вариантов реализации на основе представленных в данном тексте идеи и методологических принципов. Стоит понимать, что употребляемая в данном тексте фразеология и терминология имеет цель описания, но не ограничения, поэтому специалистам в данной области техники следует интерпретировать терминологию или фразеологию описания настоящего изобретения в свете его идеи и методологических принципов.

Существование других вариантов реализации изобретения будет очевидным для специалистов в данной области техники из приведенных в тексте обсуждения и реализации изобретения. Описание изобретения и примеры стоит рассматривать как иллюстративные, а подлинные суть и объем данного изобретения определены прилагающейся формулой изобретения.

Все перечисленные в данном тексте патентные публикации в полном объеме включены в текст посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный белок, содержащий белок фактора VIII (Ф VIII) и фрагмент фактора Виллебранда (ФВ), содержащий домен D' и домен D3 ФВ, при этом указанный фрагмент ФВ и указанный белок Ф VIII соединены друг с другом посредством взаимодействия, которое является достаточно сильным для предотвращения диссоциации указанного фрагмента ФВ от указанного белка Ф VIII в присутствии эндогенного ФВ.

2. Химерный белок по п.1, отличающийся тем, что указанное взаимодействие между указанным фрагментом ФВ и указанным белком Ф VIII является более сильным, чем природное нековалентное взаимодействие между белком Ф VIII и фрагментом ФВ.

3. Химерный белок по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ модифицирован с целью усиления взаимодействия между указанным фрагментом ФВ и указанным белком Ф VIII.

4. Химерный белок по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ модифицирован с целью усиления аффинности связывания указанного фрагмента ФВ с указанным белком Ф VIII.

5. Химерный белок по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит мутацию, при этом указанная мутация включает мутацию одной или более аминокислоты, которая влияет на аффинность связывания указанного фрагмента ФВ с указанным белком Ф VIII.

6. Химерный белок по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 764 последовательности SEQ ID NO: 2, мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 773 последовательности SEQ ID NO: 2, или обе указанные мутации.

7. Химерный белок по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит остаток серина в положении, соответствующем положению 764 последовательности SEQ ID NO: 2.

8. Химерный белок по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит остаток лизина в положении, соответствующем положению 773 последовательности SEQ ID NO: 2.

9. Химерный белок по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ модифицирован с целью усиления аффинности связывания указанного фрагмента ФВ с указанным белком

Ф VIII, при этом указанный фрагмент ФВ содержит модификацию, выбранную из группы, состоящей из пэглирования, гликозилирования, гэкилирования, полисиалирования и любой их комбинации.

10. Химерный белок по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что домен D' содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотам от 764 до 866 из SEQ ID NO: 2, и/или отличающийся тем, что домен D3 содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотам от 867 до 1240 из SEQ ID NO: 2.

11. Химерный белок по любому из пп.1-5 и 9, отличающийся тем, что домен D' содержит аминокислоты с 764 до 866 из SEQ ID NO: 2, и/или при этом домен D3 содержит аминокислоты от 867 до 1240 из SEQ ID NO: 2.

12. Химерный белок по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанный белок Ф VIII содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 18, при этом указанный белок Ф VIII обладает активностью Ф VIII.

13. Химерный белок по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что указанный белок Ф VIII содержит тяжелую цепь фактора VIII и легкую цепь фактора VIII, при этом указанная тяжелая цепь фактора VIII содержит аминокислоты от 1 до 740 последовательности SEQ ID NO: 16, и при этом указанная легкая цепь фактора VIII содержит аминокислоты от 1649 до 2332 последовательности SEQ ID NO: 16.

14. Химерный белок по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что время полужизни белка Ф VIII продлевается за пределы ограничения времени полужизни белка Ф VIII в присутствии эндогенного ФВ.

15. Химерный белок по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит по меньшей мере один гетерологичный компонент (H1).

16. Химерный белок по п.15, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент (H1) содержит константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любые комбинации этих компонентов.

17. Химерный белок по п.15 или 16, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент содержит альбумин или его фрагмент.

18. Химерный белок по любому из пп.15-17, отличающийся тем, что указанный химерный белок содержит линкер между фрагментом ФВ и гетерологичным компонентом (H1), который является отщепляемым линкером.

19. Химерный белок по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что указанный белок Ф VIII содержит Ф VIII и по меньшей мере один гетерологичный компонент (H2).

20. Химерный белок по п.19, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент (H2) содержит константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), его производное, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент или любые комбинации этих компонентов.

21. Химерный белок по п.19 или 20, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент (H2) содержит Fc-область.

22. Химерный белок по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что указанный белок Ф VIII содержит одноцепочечный Ф VIII.

23. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерный белок по любому из пп.1-22.

24. Вектор или набор векторов, содержащие полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п.23 и один или более промоторов, функционально связанных с полинуклеотидом или набором полинуклеотидов.

25. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п.24.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный белок по любому из пп.1-22 и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечением, у нуждающегося в этом пациенте, включающий введение эффективного количества белка Ф VIII и введение эффективного количества химерного белка, содержащего фрагмент фактора Виллебранда (ФВ), содержащий домен D' и домен D3 ФВ, при этом указанный фрагмент ФВ и указанный белок Ф VIII соединены друг с другом посредством взаимодействия, которое является достаточно сильным для предотвращения диссоциации указанного фрагмента ФВ от указанного белка Ф VIII в присутствии эндогенного ФВ.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанное взаимодействие между указанным фрагментом ФВ и указанным белком Ф VIII является более сильным, чем природное нековалентное взаимодействие между белком Ф VIII и фрагментом ФВ.

29. Способ по любому из пп.27, 28, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ модифицирован с целью усиления взаимодействия между указанным фрагментом ФВ и указанным белком Ф VIII.

30. Способ по любому из пп.27-29, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ модифицирован с целью усиления аффинности связывания указанного фрагмента ФВ с указанным белком Ф VIII.

31. Способ по любому из пп.27-30, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит мутацию, при этом указанная мутация включает мутацию одной или более аминокислоты, которая влияет на аффинность связывания указанного фрагмента ФВ с указанным белком Ф VIII.

32. Способ по любому из пп.27-31, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 764 последовательности SEQ ID NO: 2, мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 773 последовательности SEQ ID NO: 2, или обе указанные мутации.

33. Способ по любому из пп.27-32, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит остаток серина в положении, соответствующем положению 764 последовательности SEQ ID NO: 2.

34. Способ по любому из пп.27-33, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит остаток лизина в положении, соответствующем положению 773 последовательности SEQ ID NO: 2.

35. Способ по любому из пп.27-34, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ модифицирован с целью усиления аффинности связывания указанного фрагмента ФВ с указанным белком Ф VIII, при этом указанный фрагмент ФВ содержит модификацию, выбранную из группы, состоящей из пэгилирования, гликозилирования, гэкилирования, полисиалирования и любой их комбинации.

36. Способ по любому из пп.27-35, отличающийся тем, что указанное заболевание или состояние, связанное с кровотечением, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричревного кровоизлияния, кровоизлияния в брюшную полость, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и любых их комбинаций.

37. Способ по любому из пп.27-36, отличающийся тем, что указанный фрагмент ФВ содержит по меньшей мере один гетерологичный компонент (H1).

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент (H1) содержит константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, полизиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), их производные или любые комбинации этих компонентов.

39. Способ по п.37 или 38, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент (H1) содержит альбумин.

40. Способ по любому из пп.27-39, отличающийся тем, что указанный белок Ф VIII содержит Ф VIII и по меньшей мере один гетерологичный компонент (H2).

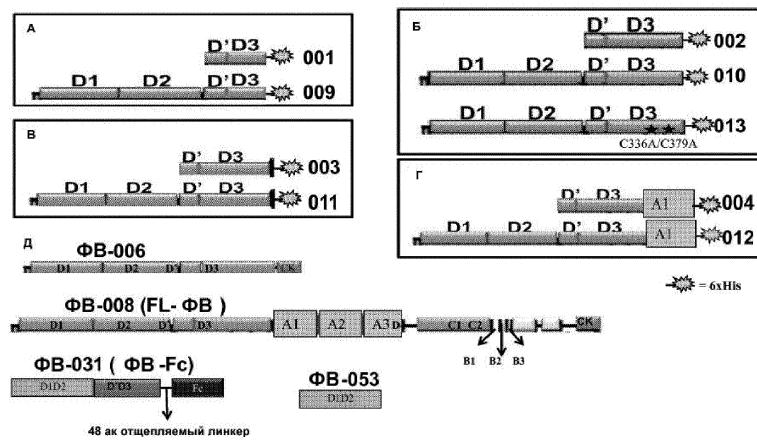
41. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанный гетерологичный компонент (H2) содержит константную область иммуноглобулина или ее часть, альбумин или его фрагмент, полизиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксизтиловый крахмал (ГЭК), его производное, альбуминсвязывающее вещество, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент или любые комбинации этих компонентов.

42. Способ по любому из пп.37-41, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один гетерологичный компонент (H1), указанный по меньшей мере один гетерологичный компонент (H2) или оба указанных компонента содержат партнер по связыванию FcRn.

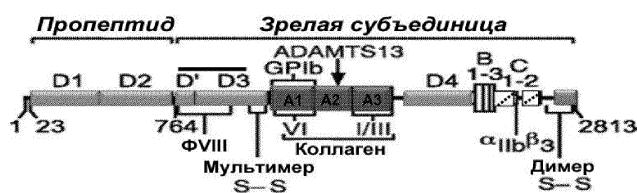
43. Способ по п.42, отличающийся тем, что указанный партнер по связыванию FcRn содержит Fc-область.

44. Способ по любому из пп.37-43, отличающийся тем, что указанный химерный белок содержит линкер между фрагментом ФВ и указанным гетерологичным компонентом (H1), который является отщепляемым линкером.

45. Способ по любому из пп.27-44, отличающийся тем, что указанный белок Ф VIII содержит однокепочечный Ф VIII.



Фиг. 1(А-Д)
Разные конструкции ФВ



- Белок ~ 250 кДа, образует мультимеры (> 20 МДа) путем дисульфидного связывания
- Объединяется с ФVIII (95-98%) в нековалентный комплекс
 - Защищает ФVIII от протеазного расщепления/активации
 - Стабилизирует тяжелую и легкую цепи
 - Предотвращает выведение ФVIII фагоцитарными рецепторами
- Выведение комплекса ФVIII-ФВ посредством ФВ-рецепторов
 - Предотвращает пиноцитоз и рециклирование рФVIIIFc?

Фиг. 1Е
Фактор Виллебранда



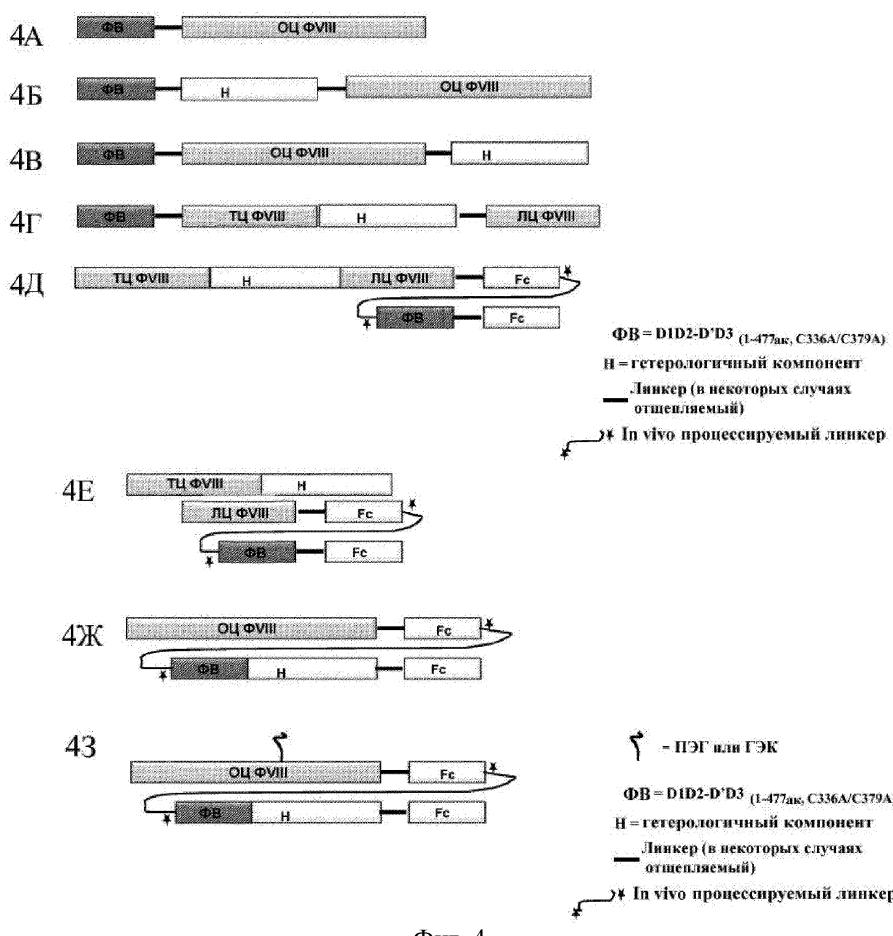
Фиг. 2
Конструкции Ф VIII (гетеродимер Ф VIII/ФВ)

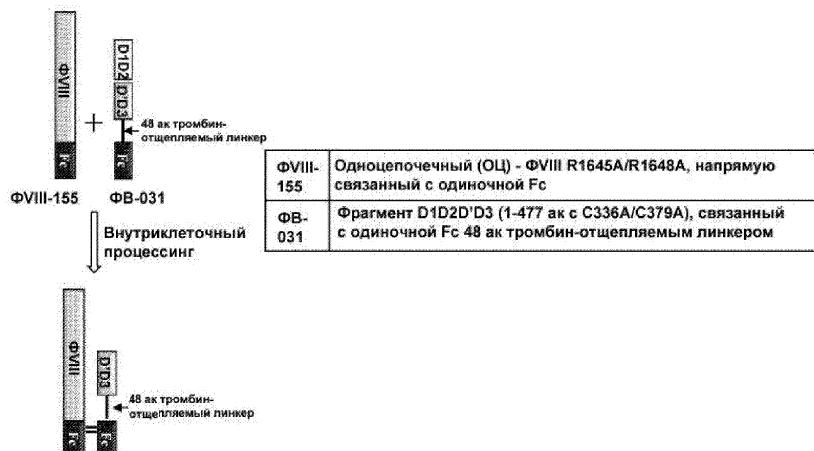
Конструкция ДНК	Линкер между ФВ и Fc
ФVIII-064	20 ак = ID {2X(GGGGS)}LVPRGSGGG
ФVIII-159	35 ак = IS{5X(GGGGS)}LVPRGSGGG
	ФVIII-160: 48 ак = IS{6X(GGGGS)}LVPRGSGGGGGGGGG
ФVIII-160 и его производные	ФVIII-180: ФVIII-160 с мутацией K2092A в C1-домене ФVIII
	ФVIII-181: ФVIII-160 с мутацией K2093A в C1-домене ФVIII
	ФVIII-182: ФVIII-160 с мутацией K2092A/F2093A в C1-домене ФVIII
ФVIII-178	73 ак = IS{11X(GGGGS)} LVPRGSGGGGGGGGG
ФVIII-179	98 ак = IS{16X(GGGGS)} LVPRGSGGGGGGGGG
ФВ = D' D3 (1-477 ак с C336A/C379A)	

ΦVIII-064, 159, 160, 178, 179

* In vivo процессируемый линкер

Фиг. 3
Конструкции Ф VIII (разные линкеры)



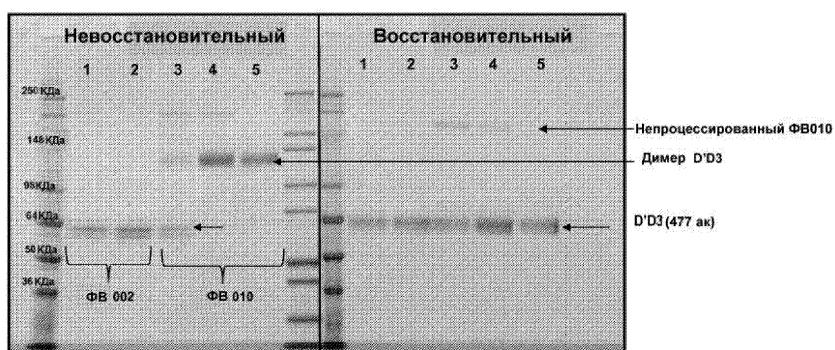


Фиг. 5
Конструкции Ф VIII (система котрансфекции)



Очищенный ФВ 009 существует в виде мономера

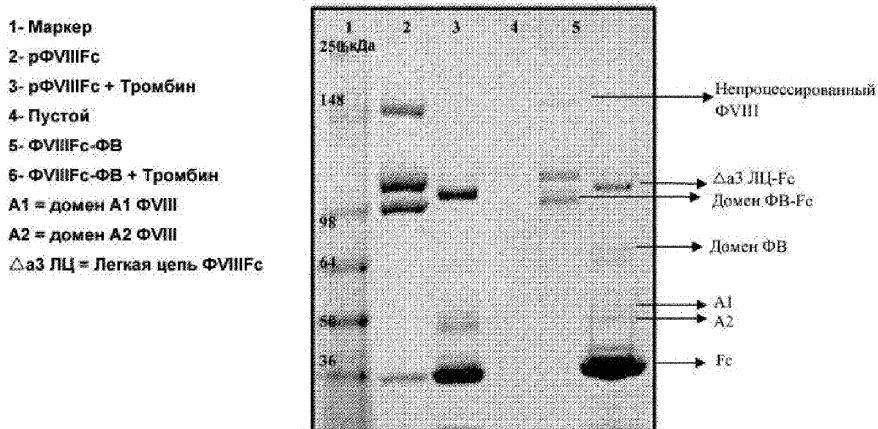
Фиг. 6
Очистка ФВ-009 (D1D2D'D3₁₋₂₇₆ак × 6 his)



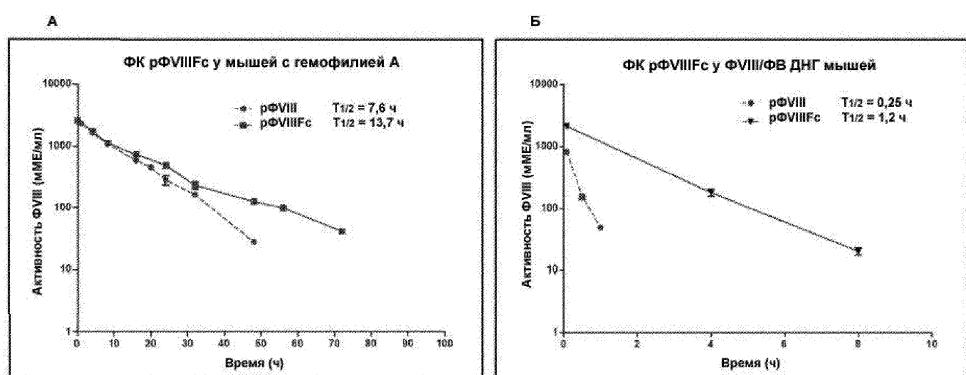
Дублет в районе 60 кДа указывает на разную форму гликозилирования

- 1- ФВ -002 АХИМ Фракция 1A3
- 2- ФВ -002 АХИМ Фракция 1B1
- 3- ФВ -010 АХИМ Фракция 1B3
- 4- ФВ -010 АХИМ Фракция 2A1
- 5- ФВ -010 АХИМ Фракция 2A2

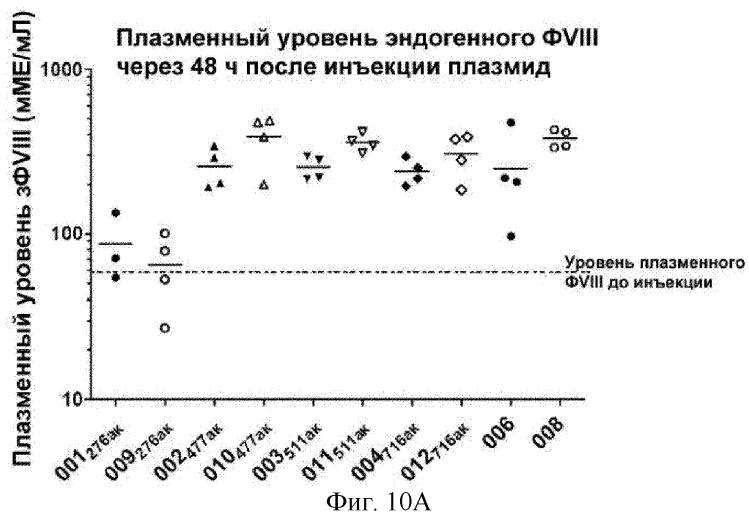
Фиг. 7
Очищенный ФВ-002 и 010 (D'D3₁₋₄₇₇ак × 6 his)



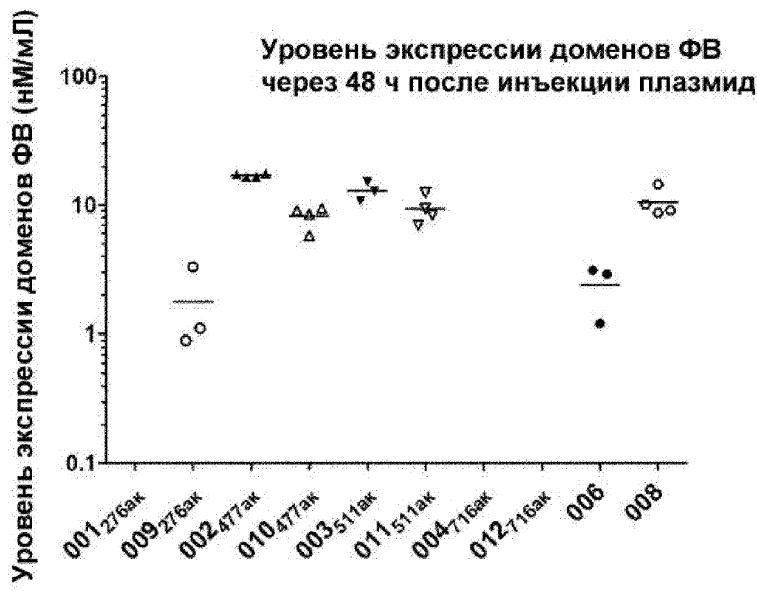
Фиг. 8
Расщепление тромбином белка Ф VIII Fc-ФВ



Фиг. 9
Взаимодействие Ф VIII-ФВ является ограничивающим фактором для продления времени полужизни VIII

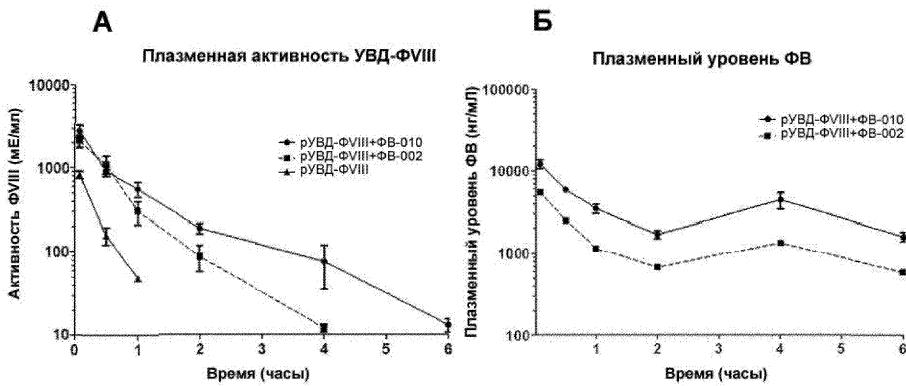


Фиг. 10А
Полноразмерный димер D'D3 обеспечивает такую же защиту Ф VIII, как и полноразмерная молекула ФВ



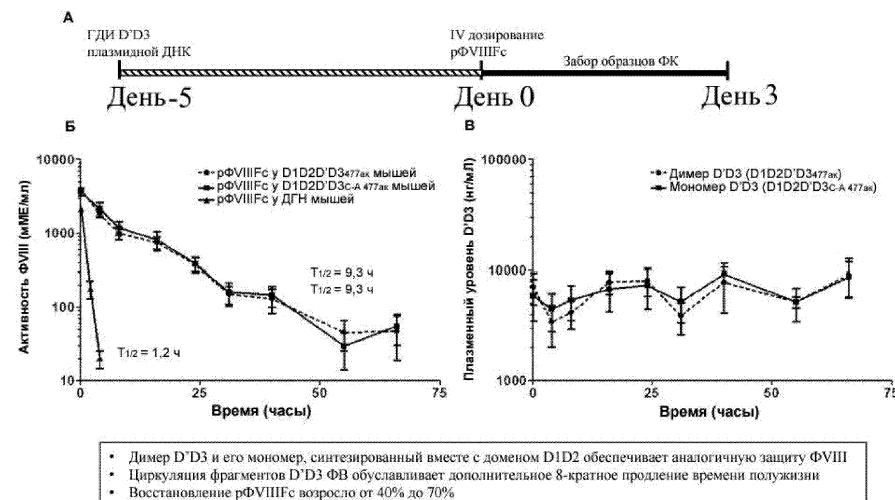
Фиг. 10Б

Полноразмерный димер D'D3 обеспечивает такую же защиту Ф VIII, как и полноразмерная молекула ФВ



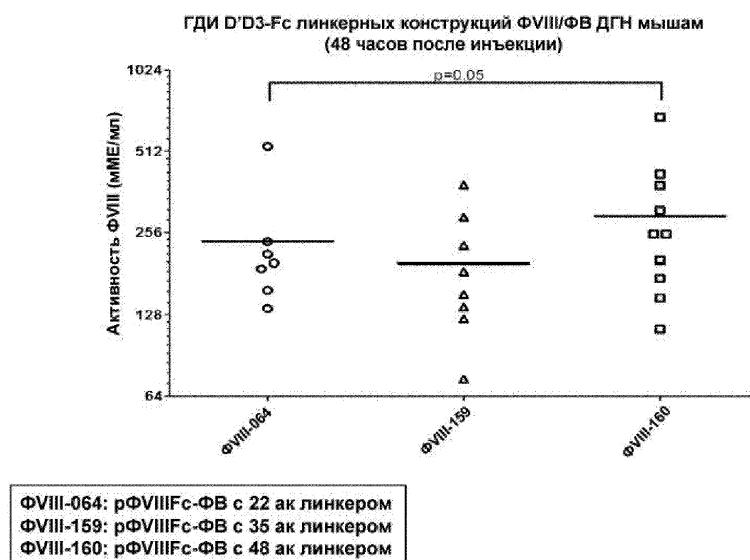
Фиг. 11

ФК УВД-Ф VIII у Ф VIII-ФВ ДГН мышей при совместной инъекции ФВ-010 или ФВ-002

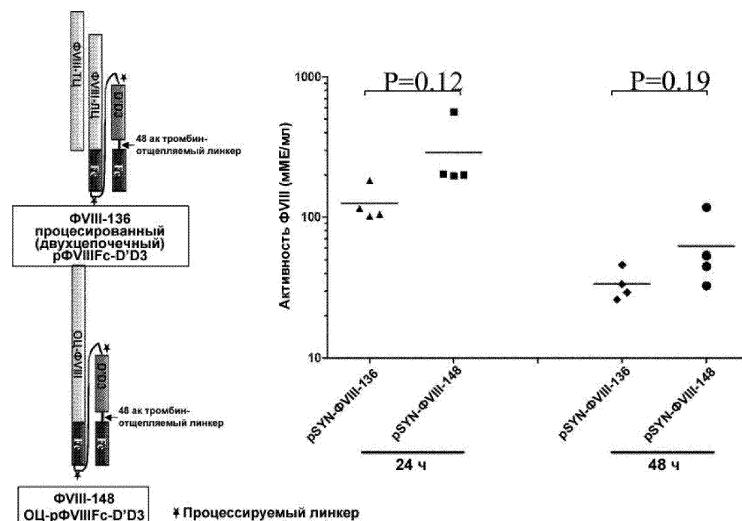


Фиг. 12

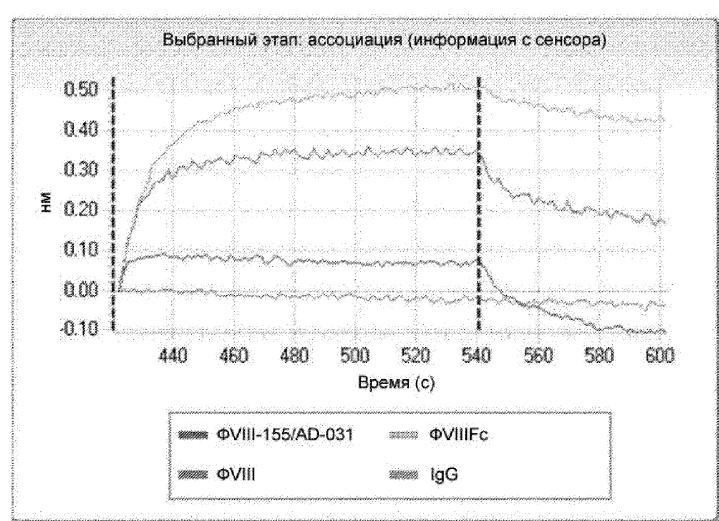
ФК рФ VIIIIFc у-мышей, экспрессирующих D'D3 ФВ



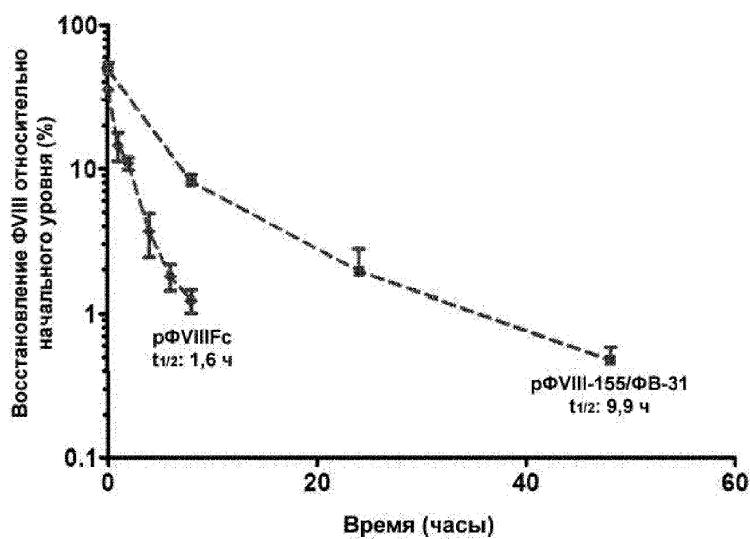
Фиг. 13
Отбор D'D3-Fc линкеров путем ГДИ у Ф VIII/ФВ ДГН мышей



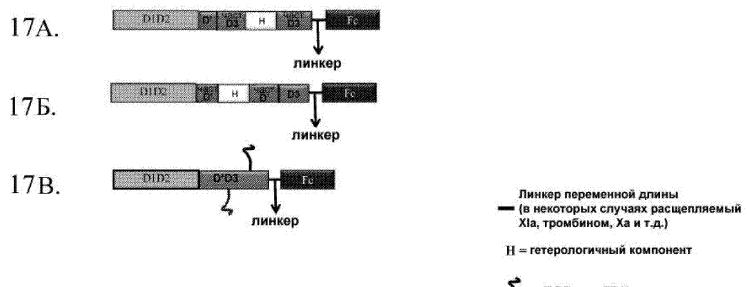
Фиг. 14
ГДИ одноцепочечного и двухцепочечного гетеродимера Ф VIIIIFc/D'D3 у Ф VIII/ФВ ДГИ мышей



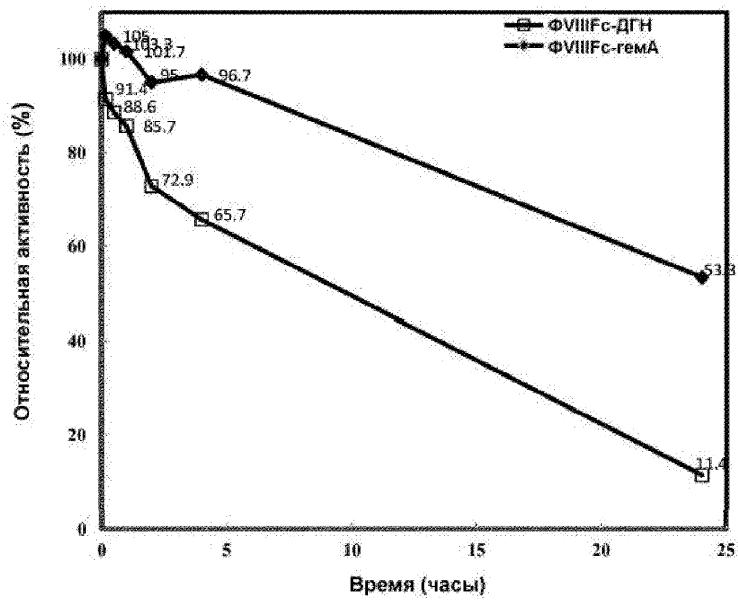
Фиг. 15
Октетный анализ Ф VIII-155/ФВ-031 связывания с иммобилизованным ФВ



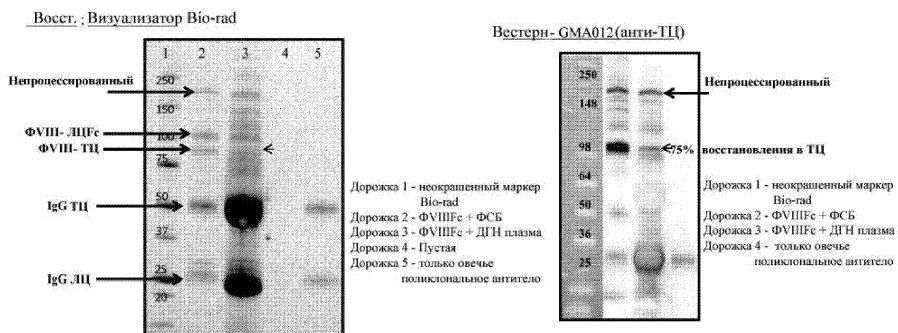
Фиг. 16
ФК Ф VIII-155/ФВ-031 и Ф VIIIIFc у Ф VIII/ФВ ДГН мышей



Фиг. 17
Конструкции ФВ



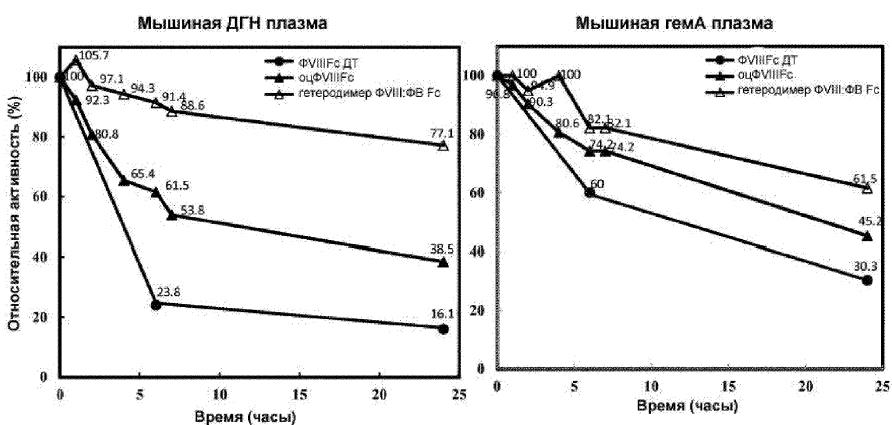
Фиг. 18А
Хромогенный анализ снижения активности Ф VIIIIFc у гемА и Ф VIII/ФВ ДГН мышей



Ход: 5 мкг ФVIIIFc инкубировали с 250 мкг ФСБ или плазмой ДГН мышей на протяжении 24 ч при 37 град. ФVIIIFc иммуопрепарировали, добавляя 5 мкг овечьего поликлонального антитела к FVIII (ab61370) на протяжении 1 ч при 4° и 100 мкг гранулы протеина A. После отмыки 4x1 мл ФСБ гранулы реусспендирували в восстановительном DСН-ПААГ буфере. 20 мкг загружали в 4-15% гель (т.е. ~ 1 мкг FVIIIFc).

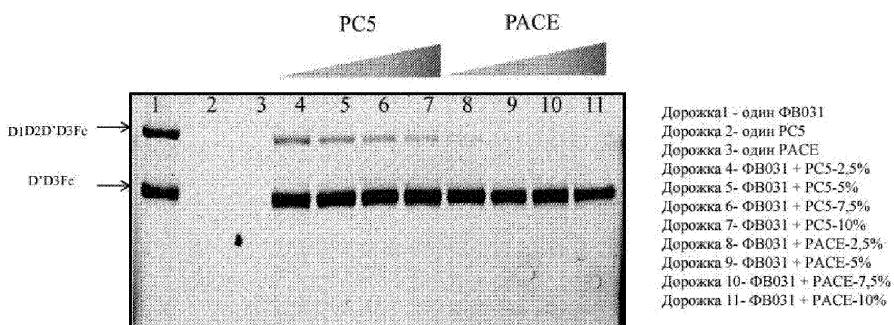
Фиг. 18Б

Снижение активности Ф VIII вследствие диссоциации/деградации тяжелой цепи (ТЦ)



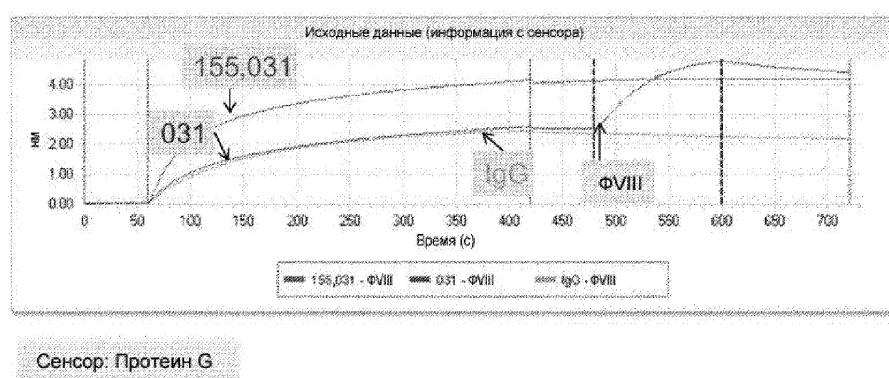
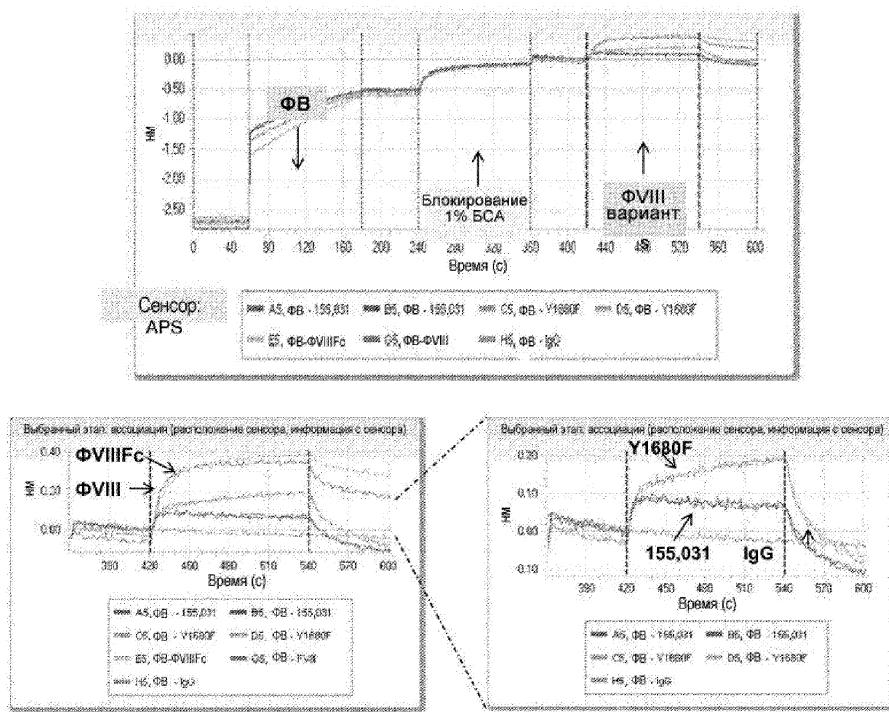
Фиг. 19

Измерение активности ФVIIIFc хромогенным методом

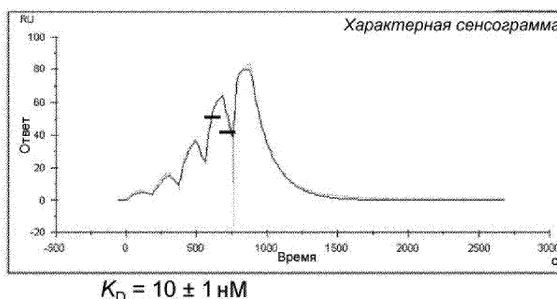


Фиг. 20

Процессинг FBO31 (D1D2D'D3Fc) PC5 или PACE

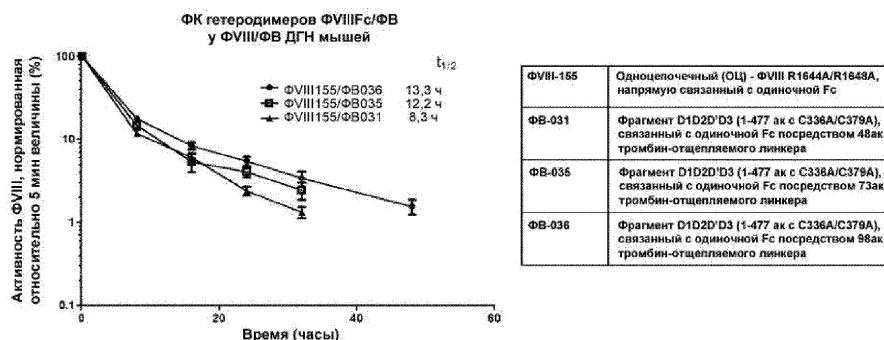


- 1000 КЕ иммобилизованного козлиного антителовеского IgG
- 100 КЕ ФВ-031
- ФVIII (с удаленным В-доменом) применяли в одноциклическом кинетическом режиме
- 1:1 соотношение; $n = 4$



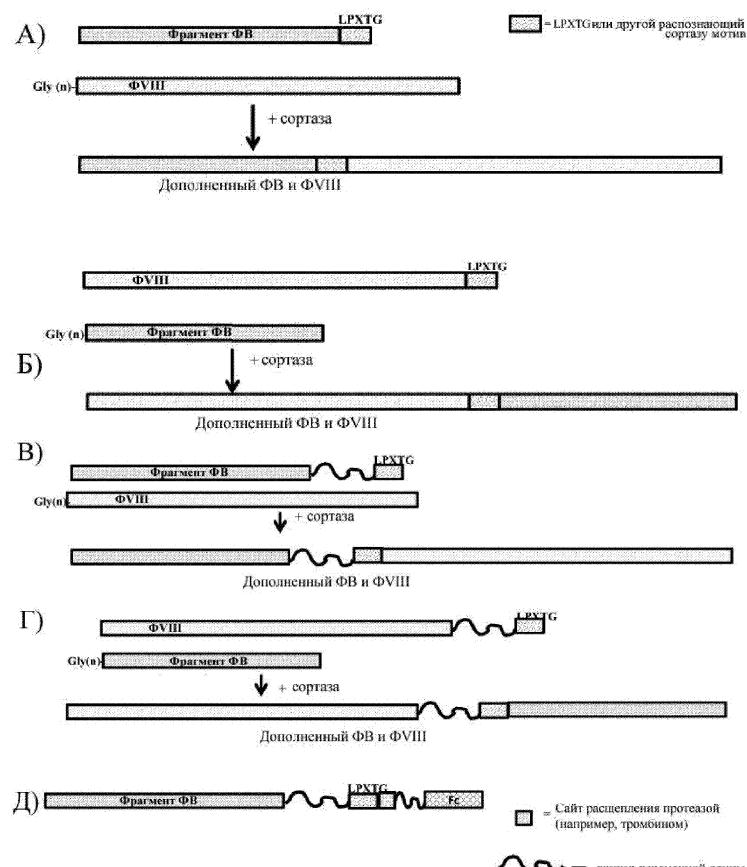
Фиг. 22

Взаимодействие Ф VIII с ФВ-031



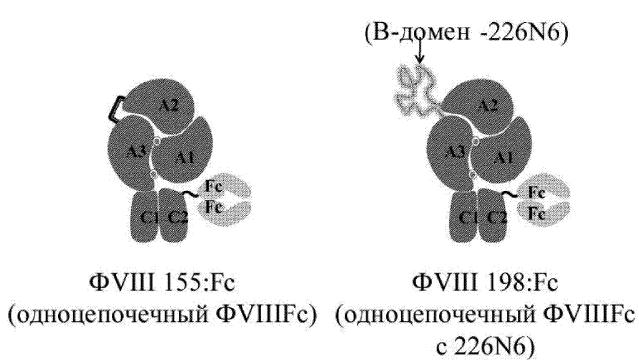
Фиг. 23

Влияние различной длины линкеров гетеродимеров ФVIII Fc/ФB на ФК у ФVIII/ФB DGN мышей



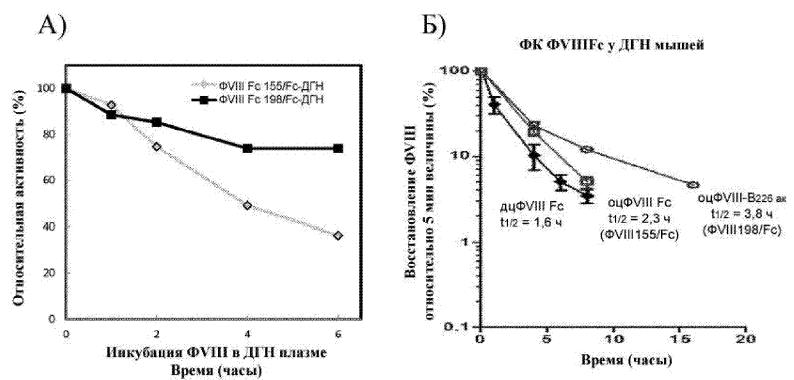
Фиг. 24

Пример лизирования сортазой



Фиг. 25

Схематическое сравнение одноцепочечного ФVIII Fc (ФVIII-155) и частичного В-домена, содержащего одноцепочечный ФVIII Fc (ФVIII-198)



Фиг. 26

Частичный В-домен увеличивает время полужизни Ф VIII-198 в 1,5 раз по сравнению с Ф VIII-155



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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