

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044349**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.08.18**

(21) Номер заявки  
**201790960**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.02.05**

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 14/745** (2006.01)  
**C07K 14/59** (2006.01)  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**A61K 38/24** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)

---

(54) **ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

---

(31) **13/372,540**

(32) **2012.02.14**

(33) **US**

(43) **2017.09.29**

(62) **201491519; 2013.02.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:  
**Фима Уди Эйял, Харт Джили (IL)**

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

(56) WO-A2-2011004361  
YOSHITAKE Shinji et al. Nucleotide sequence  
of the gene for human factor IX (antihemophilic factor  
B). Biochemistry 1985, 24, 3736-3750, фиг. 3  
WO-A1-1993006844

---

(57) Раскрыты полипептиды, включающие по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу, но не к N-концу, фактора свертывания крови, и полинуклеотиды, кодирующие указанные полипептиды. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие полипептиды и полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, и способы их применения и получения.

**В1**

**044349**

**044349**

**В1**

### Область изобретения

Раскрыты полипептиды, включающие по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хо-рионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу фактора свертывания крови, и полинуклеотиды, кодирующие их. Также описаны фармацевтические композиции, содержащие полипептиды и полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, и способы их применения и получения.

### Уровень техники

Разработка заместительной терапии фактором свертывания крови изменила жизни многих лиц, больных гемофилией. Гемофилия представляет собой группу наследственных генетических болезней, при которых нарушена способность организма контролировать свертывание крови или коагуляцию. У пациентов с гемофилией не продуцируется адекватное количество белков фактора VIII или фактора IX, которые необходимы для эффективного свертывания крови. При тяжелых случаях гемофилии даже незначительное повреждение может привести к потере крови, которая продолжается в течение нескольких дней или недель, и полное заживление может так и не наступить, что создает потенциал для постоянного инвалидизирующего повреждения суставов и других органов и к преждевременной смерти.

Один тип гемофилии, гемофилия В, представляет собой X-сцепленное нарушение свертывания крови, вызванное мутацией гена фактора IX (FIX), которое приводит к потере прокоагулирующей активности FIX. У пациентов с гемофилией В возникают спонтанные кровоизлияния в мягкие ткани и рецидивирующие гемартрозы, которые часто приводят к деформирующей артропатии. Современный способ лечения данных пациентов включает внутривенное введение рекомбинантного FIX. Тем не менее, стоимость лечения и относительно быстрый клиренс FIX из кровотока обуславливают потребность в разработке FIX пролонгированного действия.

Возможность получения на рынке FVIII и FIX обеспечила улучшение контроля опасных для жизни эпизодов кровотечения. Многие пациенты получают профилактическую терапию, которая снижает риск кровотечения и сопутствующих осложнений. Тем не менее, у значительной части пациентов (10-30%) вырабатываются ингибирующие антитела к введенным экзогенным FVIII и FIX. Введение FVIIa, который представляет собой обходной продукт, может усиливать гомеостаз и обеспечивать эффективное лечение пациентов с ингибирующими антителами.

Рекомбинантный FVIIa (NovoSeven®) доступен для приобретения, и он был одобрен в 1996 г. для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией с ингибирующими антителами. Тем не менее, клиренс rFVIIa происходит очень быстро, конечный период полужизни составлял 2,5 ч. В результате, пациентам, как правило, требовалось множество частых инфузий (2-3 дозы, которые нужно было вводить с интервалами в 2-3 ч) для достижения достаточного гомеостаза после легкого - умеренного кровотечения. Следовательно, существует большой интерес к разработке формы FVIIa пролонгированного действия, которая бы увеличила продолжительность кровоостанавливающей активности после однократной дозы и обеспечила возможность гораздо менее частого введения. FVIIa пролонгированного действия также повысит целесообразность длительной профилактической терапии.

Разрабатываются различные способы увеличения периода полужизни FVIIa. Тем не менее, задачей является обеспечение увеличенного периода полужизни данного белка при сохранении его биологической активности и при обеспечении отсутствия существенной иммуногенности в результате модификаций.

### Краткое описание изобретения

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид СТР-модифицированного фактора IX (FIX), состоящий из полипептида FIX и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного СТР-модифицированного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора IX (FIX), состоящий из полипептида FIX и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного СТР-модифицированного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содер-

жащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения биологического периода полужизни полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего продлевается биологический период полужизни указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего увеличивается AUC указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающего полипептид FIX и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта.

В одном варианте реализации согласно изобретению предложен способ предотвращения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, указанный способ включает этап введения субъекту СТР-модифицированного фактора свертывания крови, содержащего от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVII, что обеспечивает предотвращение гемофилии у указанного субъекта.

В другом варианте реализации изобретение относится к способу лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, указанный способ включает этап введения субъекту СТР-модифицированного фактора свертывания крови, содержащего от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, что обеспечивает предотвращение гемофилии гемофилию у указанного субъекта.

Другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидны после прочтения следующего подробного описания, примеров и фигур. Должно быть очевидно, тем не менее, что подробное описание и конкретные примеры, в то время, как в них приведены предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, даются лишь с целью иллюстрирования, поскольку различные изменения и модификации в рамках сущности и объема настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области из данного подробного описания.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1А. Представлена столбчатая диаграмма, показывающая собранные ограниченно разбавленные, трансфицированные и подвергнутые селекции клетки с вариантами FIX-СТР и FIX-СТР-СТР в присутствии 5 мкг/мл витамина К3. Осуществляли количественный анализ уровня FIX, применяя набор для твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO), и рассчитанная концентрация белка (мкг/мл) представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам. На фиг. 1В представлены микрофотографии гелей, полученных в результате электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ЭФ в ПА-АГ/ДСН) и окрашивания антителом к FIX. На микрофотографии А изображено окрашивание вестерн-блота антителом к FIX; на микрофотографии В изображено окрашивание вестерн-блота антителом, узнающим гамма-карбоксилирование. На дорожку 1 в А-В загружали образец, содержащий рекомбинантный FIX, на дорожку 2 в А-В загружали образец, содержащий собранный FIX-СТР. На дорожку 3 в А-В загружали образец, содержащий собранный FIX-(СТР)<sub>2</sub>.

Фиг. 2. Представлена диаграмма, показывающая сравнительную хромогенную активность собранного FIX-СТР и FIX-(СТР)<sub>2</sub> (измеряли с помощью концентрации EC<sub>50</sub>) по сравнению с рекомбинантным FIX человека (rhFIX) (American Diagnostics).

Фиг. 3. Представлена диаграмма, показывающая ФК профиль rhFIX, собранного FIX-СТР-СТР и собранного FIX-СТР.

Фиг. 4. Представлена столбчатая диаграмма, показывающая уровень антигена FIX в собранном FIX-СТР и собранном FIX-СТР-СТР и для очищенного белка FIX-СТР-СТР, что определяли, применяя набор для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка (мкг/мл) представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам.

Фиг. 5. Представлены микрофотографии гелей ЭФ в ПААГ/ДСН узнавания FIX антителом. На микрофотографии А изображено окрашивание кумасси бриллиантовым голубым; на микрофотографии В изображено окрашивание вестерн-блота антителом к FIX; на микрофотографии С изображено окрашивание вестерн-блота антителом, узнающим гамма-карбоксилирование. На дорожку 1 в А-С загружали образец, содержащий FIX-(СТР)<sub>2</sub>. На дорожку 2 в А-С загружали образец, содержащий свободный FIX-(СТР)<sub>2</sub>. На дорожку 3 в А-С загружали образец, содержащий концентрированный элюат FIX-(СТР)<sub>2</sub>.

Фиг. 6. Представлена диаграмма, показывающая хромогенную активность FIX-(СТР)<sub>2</sub> (концентрация образца/оптическая плотность (О.П.)) по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека и rhFIX (American Diagnostics).

Фиг. 7. Представлена диаграмма, показывающая ФК профиль очищенного FIX-СТР-СТР, rhFIX, собранного FIX-СТР-СТР и собранного FIX-СТР.

Фиг. 8. Представлено окрашивание антителом к СТР и антителом, узнающим гамма-карбоксилирование, вестерн-блотов FIX, слитого с тремя, четырьмя или пятью СТР. Собранные FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя поликлональные антитела (АТ) к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica).

Фиг. 9. Представлено обнаружение FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> с помощью кумасси бриллиантового голубого. После процесса очистки с применением колонки Якалин (Jacalin) (иммуноаффинная очистка гликозилированных белков), FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Гели ЭФ в ПААГ/ДСН окрашивали красителем кумасси бриллиантовым голубым для обнаружения образца.

Фиг. 10. Представлена хромогенная активность FIX. Сравнительную оценку активности *in vitro* полностью очищенных (на колонке с гидроксипатитом (ГА-колонке)) FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Готовили серийные разведения всех образцов и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарственного средства, состоящего из нормальной плазмы человека.

Фиг. 11. Представлен сравнительный фармакокинетический (ФК) профиль FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>. Осуществляли количественный анализ концентрации FIX в образцах плазмы, применяя наборы для Elisa FIX человека (Affinity Biologics). Рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени. Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0.

Фиг. 12. Представлен анализ FIX-СТР<sub>3</sub> с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН с последующим окрашиванием кумасси гелей ЭФ в ПААГ/ДСН. Гамма-карбоксилированный обогащенный белок FIX-СТР<sub>3</sub>, rhFIX и rFIXa (активированный FIX) загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью окрашивания кумасси осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовый голубой (800 нг белка) (фиг. 12А). Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) осуществляли, применяя 100 нг белка и поликлональные АТ к FIX человека (фиг. 12В), моноклональное антитело, узнающее гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499, 3570) (фиг. 12С), поликлональные АТ к пропептиду FIX (фиг. 12D) и поликлональные АТ к СТР (фиг. 12Е).

Фиг. 13. Представлена хромогенная активность FIX-СТР<sub>3</sub>. Сравнительную оценку активности *in vitro* собранного FIX-СТР<sub>3</sub> и гамма-карбоксилированного обогащенного белка FIX-СТР<sub>3</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Готовили серийные разведения собранного FIX-СТР<sub>3</sub> и белка и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарственного средства, состоящего из нормальной плазмы человека.

Фиг. 14. Представлено сравнительное время свертывания крови. Осуществляли анализ *in vitro* АЧТВ (активированного частичного тромбопластинного времени), сравнивая свертывающую активность FIX-СТР<sub>3</sub> с VeneFIX. Готовили серийные разведения белков и вводили в плазму, обедненную FIX человека, и оценивали время свертывания крови.

Фиг. 15. Представлен сравнительный ФК профиль FIX-СТР<sub>3</sub>. Осуществляли количественный анализ

концентрации FIX, применяя наборы для Elisa FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени.

Фиг. 16. Представлены параметры профиля активности. Параллельно с взятием образцов на ФК, оценивали свертывающую активность образцов цитратной плазмы животных, лишенных FIX, которым вводили либо BeneFIX®, либо FIX-СТР<sub>3</sub>, с помощью анализа АЧТВ, результаты которого преобразовывали в % активности. % активности в каждый момент сбора рассчитывали как текущее время свертывания/время свертывания объединенной нормальной плазмы мыши \* 100.

Фиг. 17. Представлены параметры первого теста с кровотечением. Мышам, лишенным FIX, вводили однократную внутривенную инъекцию 100 МЕ/кг BeneFIX® или rFIX-СТР<sub>3</sub>. Хвостовую вену слегка пересекали через 48 ч после введения и оценивали время кровотечения из хвостовой вены (ВКХВ) и интенсивность кровотечения (оптическая плотность (О.П.) гемоглобина). Второе тест с кровотечением осуществляли через 15 мин после достижения гомеостаза, и измеряли те же параметры.

Фиг. 18. Представлены параметры второго теста с кровотечением. Как только первое кровотечение, описанное в подписи к фиг. 19, остановилось самопроизвольно или было остановлено вручную, осуществляли второе тест с кровотечением через 15 мин после первого, и заново измеряли время и интенсивность кровотечения.

Фиг. 19. Представлена схема, на которой проиллюстрирована конструкция rFVII-СТР (А), конструкция rFVII-СТР-СТР (В), конструкция rFIX-СТР (С) и конструкция rFIX-СТР-СТР (D).

Фиг. 20А. Представлена столбчатая диаграмма, показывающая собранные трансфицированные подвергнутыми ограниченному разведению клонами с вариантами FVII-СТР и подвергнутые селекции клетки в присутствии 5 мкг/мл витамина К3. Уровень FVII измеряли, применяя ELISA для FVII (AssayPro).

Фиг. 20В. Представлена столбчатая диаграмма, показывающая собранные трансфицированные подвергнутыми ограниченному разведению клонами с вариантами FVII-СТР и подвергнутые селекции клетки в присутствии 5 мкг витамина К3. Активность FVII измеряли, применяя анализ хромогенной активности FVII (AssayPro).

Фиг. 20С. Представлена столбчатая диаграмма, показывающая собранные трансфицированные подвергнутыми ограниченному разведению клонами с вариантами FVII-СТР и подвергнутые селекции клетки в присутствии 5 мкг витамина К3. Удельную активность FVII рассчитывали для каждого варианта путем деления значения активности на концентрацию собранного FVII.

Фиг. 20D. Представлена диаграмма, показывающая ФК профиль собранных FVII, FVII-СТР-СТР и FVII-СТР.

Фиг. 21. Представлены вестерн-блоты FVII, слитого с тремя, четырьмя и пятью СТР, обнаруженного с помощью антитела к FVII, антитела к СТР и антитела, узнающего гамма-карбоксилирование. Собранные FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель (Expedeon), на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли посредством иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя АТ к FVII, поликлональные АТ к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica).

Фиг. 22. Представлена активность FVII - хромогенная активность. Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* очищенных на ГА-колонке (сильно гамма-карбоксилированная фракция) FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> с объединенной нормальной плазмой человека, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Готовили серийные разведения всех образцов и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарственного средства, состоящего из нормальной плазмы человека.

Фиг. 23. Представлен первый сравнительный фармакокинетический (ФК) профиль для FVII-3, 4 и 5 СТР. FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (группа А, В и С, соответственно) вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на группу лечения) в дозе 250 мкг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5 2, 5, 8, 24, 48, 72 и 96 ч после введения. Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Для FVII-СТР<sub>5</sub> продемонстрировали лучший профиль по сравнению с двумя другими вариантами.

Фиг. 24. Представлен второй сравнительный ФК профиль для FVII-3, 4 и 5 СТР. FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> после селекции FVII и процесса очистки на ГА-колонке (группа А, В и С, соответственно) вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по три крысы на вещество) в дозе 29,45 мкг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5 2, 8, 24, 48 и 72 ч после введения. Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

Фиг. 25. Представлена принципиальная схема процесса очистки FVII-СТР<sub>3</sub>. Партию 31 получали для исследования ФК/фармакодинамики (ФД). Партию 38 получали для исследования выживаемости.

Фиг. 26. Представлен ЭФ в ПААГ/ДСН и вестерн-блоттинг конечного FVII и FVIIa. 10 мкг (партия

31) или 5 мкг (партия 38) загружали на каждую дорожку геля для ЭФ в ПААГ/ДСН, который окрашивали кумасси. 1 мкг белка загружали на каждую дорожку геля для вестерн-блоттинга. 1. Полипептид FVII-СТР<sub>3</sub>; 2. Тяжелая цепь, включающая 3х СТР; 3. Легкая цепь. Все три антитела детектировали FVII. Тяжелую цепь FVIIa детектировали антителом к СТР и легкую цепь детектировали антителами как к FVII, так и к GlA.

Фиг. 27. Показано, что хромогенная активность FVII-СТР<sub>3</sub> повышалась в результате очистки на колонке с керамическим гидроксипатитом (ГА). Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* собранного FVII-СТР<sub>3</sub>, фракций в процессе очистки и очищенного FVII-СТР<sub>3</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Готовили серийные разведения собранного FVII-СТР<sub>3</sub> и белка и оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости с таковой для эталонного лекарственного средства нормальной плазмы человека.

Фиг. 28. Представлен ФК профиль FVIIa-СТР<sub>3</sub> по сравнению с NovoSeven® у мышей, лишенных FVIII. FVIIa-СТР<sub>3</sub> получали после селекции FVII, процесса очистки на ГА-колонке и активации. FVIIa-СТР<sub>3</sub> или NovoSeven® вводили однократной внутривенной инъекцией гемофильным мышам FVIII-/. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 и 72 ч после введения. Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа, и ФК профиль определяли на основании свертывающей активности FVIIa, применяя доступный для приобретения набор STACLOT.

Фиг. 29. Показано, что FVIIa-СТР<sub>3</sub> получали после селекции FVII, процесса очистки на ГА-колонке и активации. FVIIa-СТР<sub>3</sub> или NovoSeven® вводили однократной внутривенной инъекцией гемофильным мышам FVIII-/. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 и 72 ч после введения. Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Параметры образования тромбина оценивали в процессе ФК-эксперимента, и оценивали параметры, включающие максимальное количество на пик, количество тромбина в каждый момент времени и скорость образования тромбина.

Фиг. 30. Представлены кривые выживаемости мышей с гемофилией после рассечения хвостовой вены (РХВ). РХВ осуществляли через (А) 15 мин, (В) 24 ч или (С) 48 ч после введения. За выживаемостью мышей наблюдали в течение 24 ч после РХВ и регистрировали каждый час в течение первых 12 ч, а затем через 24 ч. На фиг. 30D кратко описана выживаемость мышей, зарегистрированная через 24 ч после РХВ. Результаты для контрольной группы (среда) являются результирующими по 3 экспериментам по 5 мышей/эксперимент.

Фиг. 31. Представлены иммуноблоты FVII - 3 СТР и FVII - 5 СТР. А) блоттинг GLA, В) блоттинг FVIIa, С) блоттинг СТР.

Фиг. 32. Представлен сравнительный ФК профиль FVII-3 и 5 СТР после селекции и очистки на ГА-колонке (FVIIS по сравнению с ГА-FVII).

Фиг. 33. Представлен сравнительный ФК профиль FVII-3 и 5 СТР. Второе исследование (внутривенное (в/в) введение по сравнению с подкожным (п/к)).

Фиг. 34. Представлены кривые выживаемости мышей с гемофилией после рассечения хвостовой вены (РХВ). РХВ осуществляли через 12 ч после п/к введения. За выживаемостью мышей наблюдали в течение 24 ч после РХВ и регистрировали каждый час в течение первых 12 ч, а затем через 24 ч.

Фиг. 35. Представлен ФК профиль MOD-5014 по сравнению с NovoSeven® после в/в или п/к введения. А) представлено в/в введение; В) представлено п/к введение.

Фиг. 36. Представлен ФК профиль MOD-5014 (клон 61 #75, #81) по сравнению с NovoSeven® после однократного п/к введения.

#### Подробное описание изобретения

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложены факторы свертывания крови пролонгированного действия и способы их получения и применения. В другом варианте реализации факторы свертывания крови пролонгированного действия содержат карбоксиконцевой пептид (СТР, также называемый молекулой СТР). В другом варианте реализации полипептиды пролонгированного действия, которые содержат фактор свертывания крови, дополнительно содержат карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). В другом варианте реализации СТР действует как защитный агент от деградации фактора свертывания крови. В другом варианте реализации СТР повышает величину максимальной концентрации ( $C_{max}$ ) фактора свертывания крови. В другом варианте реализации СТР повышает время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) фактора свертывания крови. В другом варианте реализации СТР продлевает период полужизни из кровообращения фактора свертывания крови. В некоторых вариантах реализации, СТР повышает активность фактора свертывания крови.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ увеличения биологического периода полужизни фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, вследствие чего продлевается биологический

период полужизни фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ увеличения биологического периода полужизни фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, вследствие чего продлевается биологический период полужизни фактора свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения периода полужизни из кровообращения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения периода полужизни фактора свертывания крови. Фактор свертывания крови VII (FVII) представляет собой гликопротеин, состоящий из 444 аминокислот (50 кДа), секретируемый гепатоцитами в кровотоке в виде неактивного профермента. При повреждении ткани и при контакте с циркулирующей кровью, FVII образует комплекс с тканевым фактором (TF), который представляет собой истинный рецепторный белок для FVII и экспрессируется различными клетками, локализованными в более глубоких слоях стенки сосуда. Образование данного комплекса FVII-TF приводит к активации FVII. Активированный FVII (FVIIa) запускает внешний путь свертывания крови путем активации фактора IX и фактора X.

FVII принадлежит к группе зависимых от витамина К гликопротеинов, связанных с системой свертывания крови. Кроме FVII, данная группа состоит из фактора IX, фактора X, протеина С и протромбина. Данные белки обладают сходной доменной организацией и синтезируются в виде предшественников с N-концевым пропептидом, за которым следует зрелая последовательность аминокислот. Пропептид содержит сайт присоединения гамма-карбоксилазы, которая превращает глутаминовую кислоту (Glu) в гамма-карбоксиглутаминовую кислоту (Gla). За этим доменом следует два домена, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), соединительный участок (СУ) и С-концевой домен сериновой протеазы. Перед секрецией, пропептид FVII отщепляется, образуя состоящий из 406 аминокислот одноцепочечный зимоген гликопротеина FVII. После секреции, белок можно активировать путем расщепления в СУ с получением связанного дисульфидной связью двухцепочечного гетеродимера, FVIIa. Концентрация FVII в плазме составляет 10 нМ и приблизительно 1% циркулирует в активной форме у здоровых индивидов.

Фактор IX (FIX) представляет собой гликопротеин, состоящий из 415 аминокислот (55 кДа); он принадлежит к группе зависимых от витамина К гликопротеинов, связанных с системой свертывания крови. FIX обладает сходной доменной организацией с фактором FVII, фактором X, протеином С и протромбином, которые синтезируются в виде предшественников с N-концевым пропептидом, за которым следует зрелая последовательность аминокислот.

FIX секретируется в виде одноцепочечной молекулы, которая подвергается сложным посттранскрипционным модификациям, многие из которых необходимы для его биохимических и фармакокинетических свойств. Среди всех посттранскрипционных модификаций, 12 остатков глутаминовой кислоты около аминоконца FIX, которые гамма-карбоксилируются зависимой от витамина К гамма-карбоксилазой, являются наиболее важными. Карбоксилирование необходимо для взаимодействия FIX с фосфолипидными поверхностями и для оптимальной активности FIX. Аминоконцевой пропептид служит сайтом узнавания для гамма-карбоксилазы и, таким образом, после гамма-карбоксилирования он отщепляется сериновой протеазой аппарата Гольджи, известной как фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот (РАСЕ/фурин). В аппарате Гольджи могут произойти четыре дополнительные посттранскрипционные модификации: сульфатация тирозина 155, фосфорилирование серина 158, O-гликозилирование по серину Ser 63 и 61 и, наконец, N-гликозилирование по аспарагину Asn 157 и 16, - но не было выявлено их необходимости для правильной активности FIX.

FIX циркулирует в плазме (средняя концентрация 5 мкг/мл) в виде одноцепочечного неактивного зимогена. При протеолитическом расщеплении двух пептидных связей Arg 145 и Arg 180 одним или двумя физиологическими активаторами, комплексом FVIIa-TF или FIXa, активационный пептид удаляется, превращая FIX в полностью активный фермент, состоящий из легкой и тяжелой цепи, которые скрепляются одной дисульфидной связью. N-концевая легкая цепь содержит некаталитическую гамма-карбоксиглутаминовую кислоту (Gla) и два домена, подобных эпидермальному фактору роста, тогда как С-концевая тяжелая цепь содержит трипсин-подобный каталитический домен молекулы. FIXa отдельно обладает слабой каталитической активностью. Тем не менее, когда он образует комплекс с FVIII, его протеолитическая активность возрастает на 4-5 порядков величины по отношению к его природному субстрату FX.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ увеличения биологического периода полужизни или способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, вследствие чего продлевается биологический период полужизни или увеличивается AUC фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ увеличения биологического периода полужизни или способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, вследствие чего продлевается биологический период полужизни или увеличивается AUC фактора свертывания крови. В другом варианте ре-





сиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор свертывания крови, обладающий доменной организацией, сходной или идентичной доменной организации FIX, FVII, фактора X, протеина С или протромбина. В другом варианте реализации фактор свертывания крови синтезируется в виде предшественника с N-концевым пропептидом. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, находится в неактивной форме профермента. В другом варианте реализации фактор свертывания крови продуцируется в гепатоцитах. В другом варианте реализации фактор свертывания крови содержит сайт присоединения гамма-карбоксилазы, которая превращает глутаминовую кислоту (Glu) в гамма-карбоксиглутаминовую кислоту (Gla). В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, представляет собой доступный для приобретения фактор свертывания крови.

В одном варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII, включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

```
ctcgaggacatggtctccagggcctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgctgctggctgcagctcttcaacccaggagga
agcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgccaacgcgttctcgaggagctgcggccgggctccctggagaggagtgcaagg
aggagcagtgctccttcgaggaggccgggagatctcaaggacgaggagagcgaagctgttctggatttctacagtgtggggacc
agtgtcctcaagtccatgccagaatggggctcctgcaaggaccagctccagctctatctctctcctccctgccttcgagggccgg
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagctactgcagtgaccacacgggaccaaa
gcgctcctgtcgggtgccacgaggggtactctctctgctggcagacggggtgtcctgacacccacagttgaatatccatgtgaaaaatacct
attctagaaaaaagaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggcaagggtgtccccaaggggagtgccatggcaggtcct
gtgtgtggaatggagctcagttgtgtgggggaccctgatcaaccatctgggtggtctccgcgcccactgttgcacaaatcaaga
actggaggaacctgatcgcgggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcggggtggcgaggtc
atcatccccagcagctacgtcccgggaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcaccagcccgtgtcctcactgaccatgtg
gtgcccctctgctgcccgaacgggacgttctctgagaggacgctggcctctgctgcttctcattggtcagcggtggggccagctgctgg
accgtggcgccacggcctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggaactgctgcagcagctacggaagggtggg
agactcccaaatatcacggagtacatgttctgtccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggccac
atgcccccactaccgggacgtgtgacgtgacgggcatcgtcagctggggccagggtgcgcaaccgtgggccactttggggtgac
accagggtctcccagtaacatcgatgggtgcaaaagctcatcgctcagagccacgcccaggagtctcctcgcagccccattccctga
ggatgcgccgc (SEQ ID NO: 11).
```

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII включает следующую последовательность аминокислот:

```
MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTGRSCRHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
LEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKI
KNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR
KVGDSPNITEYMFCAGYS DGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 9).
```

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII включает следующую последовательность аминокислот:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
 QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN  
 CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIP  
 ILEKRNASKPQGRIVGGK VCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKI  
 KNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLT  
 DVH VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR  
 KVG DSPNITEYMFCA GYS DGS KDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
 HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP\*GCGR (SEQ ID NO: 10).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII-СТР (присоединенный к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctcaggacatggtctcccagccctcaggctcctctgcttctgctgggcttcagggctgcctggctgctgagctctcgaaccaggaggga  
 agcccacggcgtcctgcaccggcggcgccgcaacgcgttctggaggagctgcggccgggctccctggagaggagtgcaagg  
 aggagcagtgctcctcaggaggccgggagatctcaaggacgggagaggacgaagctgttctgattcttacatgatggggacc  
 agtgtgctcaatccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctgctccctgccttcaggggccg  
 aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcgctgtgagcagctgacagtgaccacacgggaccaa  
 gcgctcctgtcggcgccagagggtactctctgctggcagacggggtgctcctgcacaccacagtgaaatccatgtgaaaaatacct  
 attctagaaaaaagaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccccaaaggggagtgccatggcaggtcct  
 gttgttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaaccacctctgggtggtctccggcgccactgtttcgacaaaatcaaga  
 actggaggaacctgatcgggtgctggcgagcagcagcctcagcagcagcaggggatgagcagagccggcggtggcgaggtc  
 atcatccccagcagctacgtcccggccaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtg  
 gtgccctctgctgcccgaacgggacgttctctgagaggagctggcctctgctgcttctcattggtcagggctggggccagctgctgg  
 accgtggcgccacggcctggagctcatggtcctcaactgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagctcacggaagggtggg  
 agactcccaaatatcacggagatcatgttctgtccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggccac  
 atgccaccactaccggggcacgtgtacc  
 tgaccggcatcgtgagctggggccagggtcgcgccaccgtggccactcggcgtgtacaccagggtgtcccagfacatcagtggtgctg  
 cagaaactgatgagaagcagcccagaccggcgtgctgctgagagccccctccccagcagcagctccaaggccccctccccctagcct  
 gcccagccctagcagactgcctggggccagcagacccccatcctccccagtgaggatccggggccgc (SEQ ID NO: 12).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII-СТР (присоединенного к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
 QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN  
 CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIP  
 ILEKRNASKPQGRIVGGK VCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKI  
 KNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLT  
 DVH VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR  
 KVG DSPNITEYMFCA GYS DGS KDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
 HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ  
 \* (SEQ ID NO: 13).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII-СТР-СТР (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctcgaggacatggctcccaggccctcaggctcctctgcttctgcttgggcttcagggtgcctggctgagctctcctaaccaggagga  
agcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttctggaggagctgcggccggctccctggagaggagtgcaagg  
aggagcagtgctccttcgaggagcccggaagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttctacagtgatggggacc  
agtgctcctaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctafatctgcttctcctccctccttcgaggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtgactgagtgaccacacgggcaccaa  
gcgctcctgtcgggtccacaggggtactctctgctggcagacgggtgtcctgcacaccacagttgaatatccatgtgaaaaatacct  
attctagaaaaaagaatgccagcaaacccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtcccaaggaggagtgccatggcaggtcct  
gttgttggtaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacacatctgggtggtctccgcggcccactgttctgacaaaatcaaga  
actggaggaacctgatcgcgggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgaggtc  
atcatccccagcagctacgtcccgggaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacatgtg  
gtcccctctgctgcccgaacggagcttctctgagaggacgtggccttctgctgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctgg  
accgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgctgcagcagtcacggaagggtggg  
agactcccaaatatcacggagtacatgttctgtcgggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccac  
atgccaccactaccggggcacgtgttacctgaccggcatcgtgagctggggccagggtcgcgccaccgtgggcccacttcggcgtgtac  
accaggggtgtcccagatcatcagtggtgcaaaaactgatgagaagcgagccagaccggcgtgctgctgagagcccccttccccag  
cagcagctccaagggccctcccctagcctgcccagccctagcagactgctgggcccctccgacacaccaatcctgccacagagcagct  
cctctaaggccccctcctccatccctgccatccccctcccggctgccaggcccctctgacaccctatcctgcctcagtgatgaaggctggtg  
ccggggccc (SEQ ID NO: 14).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII-СТР-СТР (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MVSQALRLLLGLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN  
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHDHTGKRSCRHEGYSLADGVSCTPTVEYPCGKIP  
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAAHCFDKI  
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH  
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQCSR  
KVGDSPNITEYMFACAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQ  
SSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 15).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII-СТР-СТР-СТР (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctcaggacatggctctcccaggccctcaggctcctctgcttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagtcttcgtaaccaggagga  
agcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgcaacgcgttctggaggagctgcggccgggctcctggagagggagtgcaagg  
aggagcagtgctccttcgaggaggccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttctacagtatggggacc  
agtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatactgcttctgcctcctccttcgaggggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagctactgacgtgaccacacgggacacca  
gcgctcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacggggtctctgcacacccacagttgaatatccatgtgaaaaatacct  
attctagaaaaagaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccccaaaggaggagtgccatggcaggtcct  
gtgtgtgtgatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacacctctgggtggtctccgggcccactgtttcgacaaaaataaga  
actggaggaaactgatcgcgggtctgggagcagcagcctcagcagcagcagcgggatgagcagagccggcggtggcgaggtc  
atcatcccagcagctacgtcccgggaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
gtgccctctgctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggcctctgctgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctgg  
accgtggcgccacggcctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgctgcagcagctcacggaagggtggg  
agactcccaaatatcacggagtacatgttctgtccgggtaactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggccac  
atgccaccactaccgggacgtgtactgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcccaccgtgggcccactcggcgtgtac  
accagggtgtcccagctacatcagtggtgctgcagaaactgatgagaagcagccagacccggcgtgctgctgagagcccccttcccag  
cagcagctccaaggccccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcccagtgacacccctatcctgcctcagtcagctc  
cagcaagggcccaccccctagcctgcttctccttctcggctgctgccccagcgatactccaattctgccccagctcctccagcagtaagg  
ctccccctcatctctgcatccccagcagactgccaggccctctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccggcgccgcttaa  
taa (SEQ ID NO: 24).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII-СТР-СТР-СТР (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MVSQALRLCLLLGLQGLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN  
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP  
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKI  
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRHQPVVLTDH  
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR  
KVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQCATVG  
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ  
SSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEQ ID  
NO: 25).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII-(СТР)<sub>4</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctcgaggacatggctctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggctcagggtgcctggctgcagtcttctgaaccaggagga  
agcccacggcgtcctgcaccggcggcgccgccaacgcgttctggaggagctgcggccggctccctggagagggagtgcaagg  
aggagcagtgctccttcgaggagggccgggagatctcaaggacgagagaggacgaagctgttctggatttctacagtgatggggacc  
agtgtgcctcaagtccatgccagaatggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctcctccctcagggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagctgacagtgaccacacgggcaccaa  
gcgctcctgtcggcgccaggggtactctctgctggcagacggggtgctctgcacacccacagttgaatatccatgtgaaaaatacct  
attctagaaaaagaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgcccaaggggagtgccatggcaggtcct  
gtgtgtgagatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcgccactgttctgacaaaaaataaga  
actggaggaacctgatcgggtgctggcgagcagcagcctcagcgagcagcagcgggatgagcagagccggcggtggcgaggtc  
atcatcccagcagctacgtcccggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtg  
gtgccctctgctcccgaacggacgttctctgagaggacgtggcctctgctgcttctcattggtcagcggctggggccagctgtgg  
accgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccagggactgcctgcagcagtcacggaaggtggg  
agactccccaaatacacggagtagtctgtgcccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccac  
atgccaccactaccggggcacgtgtacctgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtggggccacttcggcgtgtac  
accaggggtgtcccagtagcagtggtgctgagaaactgatgagaagcagccagaccggcgtgctgctgagagcccccttcccag  
cagcagctccaaggccccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcccagtgacaccctatcctgctcagtcagctc  
cagcaagggccccaccctagcctgcttctcctctcggctgctgcccagcgatactccaattctgccccagtcctccagcagtaagg  
ctcccctccatctctgcatccccagcagactgccaggccctctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccgc (SEQ ID  
NO: 26).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII-(СТР)<sub>4</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLEREC  
KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFE  
GRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTRKSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPC  
GKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVSAANC  
FDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVL  
TDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQ  
QSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGA  
TVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPI  
LPQSSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPILPQ\*\*G  
(SEQ ID NO: 27).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII-(СТР)<sub>5</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctcgaggacatggctctcccaggccctcaggctcctctgcttctgcttgggcttcagggctgcctggctgcagtcttcgtaaccaggagga  
agccacggcgtcctgcaccggcgcggcgcccaacgcgttctggaggagctcggccgggctccctggagaggagtgcaagg  
aggagcagtgctccttcgaggagccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattctacagtgatggggacc  
agtgctcctaagtccatgccagaatggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctcctccctccttcgaggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtgactgcagtgaccacacgggaccaa  
gcgctcctgctgggtgcccaggggtactctctgctggcagacggggtgctctgcacaccacagttgaatatccatgtggaaaaatact  
attctagaaaaaagaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggcaagggtgtcccaaggggagtgccatggcaggtcct  
gtgtgtggaatggagctcagttgtgtgggggaccctgatcaacaccatctgggtggtcctccggcggccactgttcgaaaaatcaaga  
actggaggaacctgatcgggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgaggtc  
atcatcccagcacgtacgtcccgggaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
gtccctctgctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttctgctgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctgg  
accgtggcggccacggccctggagctcatggtctcaacgtgccccggctgatgaccagggactgctgcagcagtcacggaaaggtggg  
agactcccaaatatcacggagtagatgttctgtccggctactcggatggcagaaggactcctgcaagggggacagtgaggccac  
atgccaccactaccggggcacgtgtactgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtac  
accagggtgtcccagtagcagtggtgctcagaaactgatgagaagcgagccagaccggcgtgctgctgagagccccttcccag  
cagcagctccaaggcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgctggccctctgacaccctatcctgctcagtcagctcc  
tctaaggctccaccacttccctgctagccctcaagactgccaggccctagcgataaccaattctgccccagtctccagcagcaaggc  
tccccacctagcctgcttctccatcaaggctgctggccatccgatacccaatcttgcctcagagcagctctagcaaggcacctccc  
ccagctgcccctccaagcagactcctggcccttcagacactccaatcctcccacagtcctctagctctaaagctccacctcccagctgc  
ccagccctagtagactccccggaccttctgataccccatctgccccagtgatgaggatccgc (SEQ ID NO: 28).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII-(СТР)<sub>5</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLEREC  
KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFE  
GRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPC  
GKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPCGECWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAHC  
FDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRHQPVVL  
TDHVVPLCLPERTFSLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQ  
QSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQCA  
TVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPI  
LPQSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSSKA  
PPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPILPQ\*\*GS (SEQ ID NO:  
29).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX, включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

gcgatcgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccattgccttttaggatctactcagtgctgaatgta  
cagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagttgtcaagggaacctt  
gagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaatttggaaagcagta  
tgftgatggagatcagtgtagtccaatccatgttfaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgctcccttggattt  
gaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgctgataacaaggtggtt  
tgctcgtactgagggatatgcactgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccattccatgtggaagagtttctgtttcaca  
cttctaagctcaccgctgctgagactgttttctgatgtggactatgtaaatctactgaagctgaaccatttggataacatcactcaaaagca  
ccaatcatttaatgacttcactcgagttggtgggagaagatgccaaaccaggcaattcccttggcaggtgtttgaaatggtaaagttgat  
gcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgttaaattacagttgtcgcaggtga  
acataataggagagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattatcctcaccacaactacaatgcagctattaataagta  
caacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgtaaacagctacgttacacctattgcattgctgacaaggaatacacgaa  
catcttctcaaatftggatctgctatgtaagtggctggggaagagcttccacaagggagatcagctttagttccagtagcttagagttc  
cactgttgaccgagccacatgcttcgatctacaagttcacatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggagtagagattca  
tgtcaaggagatagtgggggacccatgtfactgaagtggaggaccagtttctaactggaattattagctggggtgaagagtggtcaat  
gaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccggtatgtaactggattaaggaaaaaacaagctcacttgaacgcggccgc

(SEQ ID NO: 16).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX включает следующую последовательность аминокислот:

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
LERECMEEKCSFEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYEC  
WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP  
FPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKP  
GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQK  
RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSGSYVSG  
WGRVFNHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG  
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGYGIYTKVSRVYNWIKETKLT\* (SEQ ID NO:  
17).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-СТР (присоединенный к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtctgaatgt  
 acagttttcttgatcatgaaaacgccacaacaaattctgaatcgccaaagaggatataatcaggtaattggaagagttgtcaaggggaacc  
 ttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtatgttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaatgttgaagcagt  
 atgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtcccttggat  
 ttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgctgataacaagggtg  
 ttgctcctgactgagggatcgactgcagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgggaagagttctgttccaca  
 acttctaagctcaccctgctgagactgttttctgatgtggactatgtaattctactgaagctgaaaccatttggataacatcactcaagc  
 acccaatcattaatgactcactcaggtgttggggaagatgcaaaccaggtcaattccctggcaggtgttttgaatggtaaagttgat  
 gcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtaaaattacagttgctgcaggtga  
 acataataggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattatcctcaccacaactacaatgcagctattaataagta  
 caacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgtaaacagctacgttacacctttgattgctgacaaggaatacacgaa  
 catcttctcaaatgtgatctggctatgtaagtggctggggaagagttctccacaagggagatcagctttagttctcagtaaccttagagttcc  
 actgttgaccgagccacatgtctctgactcaaaagttcacatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcat  
 gtcaaggagatagtggggaccctgtfactgaagtgggaaggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgcaatg  
 aaaggcaaatatggaatataccaaggtatccggatgtcaactggattaaggaaaaacaaagctcactagctccagcagcaaggccc  
 ctccccgagcctgccctccccagcaggtgcctggccctccgacacccaatcctgccacagtgatgaaggtctggatccgcggcc  
 gc (SEQ ID NO: 18).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-СТР (присоединенного к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC  
 WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP  
 FPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKP  
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK  
 RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSGSYVSG  
 WGRVFNHGRSALVLQYLRVPLVDRA TCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG  
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYVNIKEKTKLTSSSSKAPPSLPS  
 PSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 19).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-СТР-СТР (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtgctgaatgt  
 acagttttcttgatcatgaaacgccacaacaaattctgaatcggccaagagggtataattcaggtaaattggaagagttgtcaaggaacc  
 ttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaacactgaaagaacaactgaattttggaagcagt  
 atgftgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgccctttggat  
 ttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaagggg  
 ttgctcctgtactgaggatcgactgcagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgttcacaa  
 acttctaagctcaccctgctgagactgttttctgatgtggactatgtaattctactgaagctgaaaccattttggataacatcactcaaagc  
 acccaatcatttaatgactcactcagttgttggtggaagaatgccaaaccaggtcaattccctggcaggtgttttgaatggtaaagtgtat  
 gcattctgtggaggctctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgttaaattacagttgtcgaggtga  
 acataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattattcctaccacaactacaatgcagctattaataagta  
 caacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtctaaccagctacgttacacctattgctgactacaaggaatacacgaac  
 atcttctcaaaatttgatctggctatgtaagtgctggggaaggtctcccaaaaggagatcagctttagttctcagtagcttagagttcca  
 ctgttgaccgagccacatgtcttgatctacaagttaccatctataacaacatgttctgtgctgcttccatgaaggaggtagagattcatgt  
 caaggagatagtgggggacccatgttactgaaagtgaaggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgcaatgaa  
 aggcaaatatggaatataccaaggtatcccgtatgtcaactggattaagaaaaacaagctcactagctccagcagcaagggccct  
 cccccgagcctgccctcccaagcaggtgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaagggccctctcca  
 tcctgccatccccctccggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggcttgatccgcggccgc (SEQ ID  
 NO: 20).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-СТР-СТР (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MQRVNMIMAEPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC  
 WCPFGFEGKNCELDVTCTNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP  
 FPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP  
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK  
 RNVIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSGSYVSG  
 WGRVFKHGRSALVLQYLRVPLVDRACTLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG  
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRVYVNIKEKTKLTSSSSKAPPSLPS  
 PSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-(СТР)<sub>3</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

tctagagtcgaccccgccatgcagcgctgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagt  
gctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgccaaagagggtataatcaggtaaattggaagagttgttca  
agggaaccttgagagagaatgfatggaagaaaagtgtagttttgagaagcagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaatftt  
ggaagcagtatggtgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaatcctatgaatggtggtg  
cccttggattgaaggaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgata  
acaaggtggttctcctgactgaggatcgcactgagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagttt  
ctgttcacaaacttcaagctcaccgtgctgaggcagttttctgatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaacctttggataacat  
cactcaaagcaccatcatttaagtactcactcgagtggtggagaagatgccaaccagggtcaattccctggcaggtgtttgaaatg  
gtaaagttgatgattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtaaaattacagttg  
cgcaggtgaacataataggagagacaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattatcctcaccacaactacaatcagccta  
ttaataagtaacacatgacattgcccttctggaactggacgaaccttagtgctaaacagctacgttacacctattgcattgctgacaagga  
atacagaacatcttctcaaatggatcgtgctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaggagatcagcttttagttctcagttacc  
ttagagttccactgttgaccgagccacatgcttctgatctacaaagttccatctataacaacatgttctgtgctgcttccatgaaggaggt  
gagattcatgcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtggaaggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagag  
tgtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccggatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcag  
caagggccctccccgagcctgcctcccccaagcaggctgcctggcccagtgacaccctatcctgcctcagctccagctccagcaagg  
ccccaccctcctgctccttctccttctcgctgcctggcccagcgaactccaattctgccccagctcctcagcagtaaggctccccctc  
catctctgccatccccagcagactgccaggcccttctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccgcgccgc (SEQ ID  
NO: 30).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-(СТР)<sub>3</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC  
WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVP  
FPCGRVSVSQTSKLTRAFAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKP  
GQFPWQVVLNGKVDAFCCGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIETEHTEQK  
RNVIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICADKEYTNIFLKFSGSYVSG  
WGRVFNHGRSALVLQYLRVPLVDRA TCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG  
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYNWIKETKLTSSSSKAPPPSLPS  
PSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSRLPGSD  
TPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 31).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-(СТР)<sub>4</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

tctagagtcgacccccccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccagcctcatcaccatctgccttttaggatctactcagt  
gctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattcgaatcggccaagagggtataattcaggtaaattggaagagttgtca  
agggaccttgagagagaatgtatggaagaaaagttagtttgaagaagcagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacactgaattt  
ggaagcagtagttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtftaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggt  
ccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatcgagcagttttgaaaaatagtctgata  
acaaggtggtttgctcctgactgaggatcgcactgcagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaaggttt  
ctgtttcacaacttctaagctcaccctgctgaggcagttttcctgatgtggactatgtaattcactgaagctgaaaccattttgataacat  
cactcaaagcacccaatcattaatgacttcactcgagttgtgtggagaagatgccaaccaggtaattccctggcaggtgtttgagt  
gtaagttgatgcattctgtggaggctctatcgttaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtaaaattacagttgt  
cgaggtgaacataataggaggacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattatcctcaccacaactacaatgcagcta  
ttaataagtacaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgattgctgacaagga  
atacacaacatcttcctcaaatgtgatctgctatgtaagtgctggggaagagcttccacaaggagatcagctttatgtctcagtagc  
ttagattccactgttgaccgagccacatgtcttcgactacaagttccacatctataacaacatgttctgtgctgctccatgaaggagga  
gagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtgaaggaccagtttcttaactggaattattagctgggggtgaagag  
tgtcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggtatccggatgtcaactggattaaggaaaaacaagctcactagctccagcag  
caagcccctccccgagcctgccctcccccaagcagcctgctgggccctctgacaccctatcctgcctcagtcagctccttaagcc  
ccaccacctcctgctgacctcaagactgccagccctagcgataaccaattctgccccagctcctcagcagcaaggctccccac  
ctagcctgcttctccatcaaggtgctgcccacccgatacccaattttgctcagagcagctctagcaaggcacctccccagctctgc  
cctctcaagcagactccctggccctcagacactccattctgccacagtgatgaggatccgcccgc (SEQ ID NO: 32).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-(СТР)<sub>4</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

SRVDPAMQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEE  
FVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDI  
NSYECWCPFGFEGKNCELDVTENIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSC  
EPAVFPFCGRVSVSQTSLTRAFAVFPDVEDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVG  
EDAKPGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETE  
HTEQKRNVIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLFGS  
GYVSGWGRVFIKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFIEGGRDSCQ  
GDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITKVSRYVNWIKETKLTSSSSKA  
PPPSLSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSR  
LPGSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSRLPGSDTPILPQ\*\*GSAA (SEQ ID NO: 33).

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-(СТР)<sub>5</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatctactcagtg  
ctgaatgtacagttttctgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgcccaagagggtataattcaggtaaattggaagagttgttcaa  
gggaacctgagagagaatgtatggaagaaaagtgtatgtttgagaagcagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacactgaatttg  
gaagcagatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgc  
cctttggattgaaaggaaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatcgagcagttttgaaaaatagtgctgataa  
caaggtggttctctgactgagggatcgcactgcagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagttc  
tgttcacaaaacttaagctcaccctgctgagggcagttttctgatgtggactatgtaatttactgaagctgaaccattttgataacatc  
actcaagcaccatcatttaagtactcactcgagttgttggtggaagaatgccaaccaggtaattccctggcaggtgttttgaatgg  
taaagtgatgcattctgtggaggctctatcgttaataaaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtaaaatfacagttgc  
gcaggtgaacataataggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaatttccctaccacaactacaatgcagctat  
taataagtacaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtctaaacagctacgttacacctattgcatgctgacaaaggaa  
tacacgaacatctcctcaaatgtgatctgctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaggagatcagctttagttcttctagctac  
tagagttccactgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggagga  
gagattcatgcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtgaaggaccagtttctaactggaattattagctggggggaagag  
tgtgcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggtatcccggatgtcaactggattaaggaaaaacaaagctcactagctccagcag  
caagggccctccccgagcctgcctcccccaagcaggctgcctggccctctgacaccctatcctgcctcagtcagctcctctaaggt  
ccaccaccttccctgctgaccctcaagactgccaggccctagcgataaccaattctgcccagctcctccagcagcaaggctccccac  
ctagcctgccttctccatcaaggctgcctggccatccgatacccaattttgctcagagcagctctagcaaggcacctccccagctctgc  
cctctcaagcagactccctggccctcagacactccaatcctcccacagctcctctagctctaaagctccacctcccagcctgccagcccta  
gtagactccccggaccttctgataccccctcttccccagtgatgaggatccggggccgc (SEQ ID NO: 34).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-(СТР)<sub>5</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

RVDPAMQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEF  
VQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDIN  
SYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCE  
PAVPFPCGRVSVSQTSLTRAEA VFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGE  
DAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEK WIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEH  
TEQKRN VIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSG  
YVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQG  
DSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYVNWIKETKLTSSSSKAPP  
PSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLP  
GPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILP  
Q\*\*GSA (SEQ ID NO: 35).

В другом варианте реализации в клетку, экспрессирующую фактор свертывания крови-СТР согласно настоящему изобретению, добавляют фурин. В другом варианте реализации фурин повышает эффективность продукции в клетке фактора свертывания крови-СТР согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации фурин котрансфицируют с вектором, включающим кодирующую последовательность фактора свертывания крови-СТР согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации фурин кодируется отдельным вектором. В другом варианте реализации фурин и фактор свертывания крови-СТР кодируются одним вектором. В другом варианте реализации последовательность, кодирующую фурин, встраивают в pCI-DHFR. В другом варианте реализации последовательность, кодирующую фурин, встраивают в pCI-dhfr/smaI+NotI, Furin/AsiI F.I.+NotI.

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фурин, включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

tctagagtcgaccccgccatggagctgagccctggtgctatgggtgtagcagcaacaggaaccttggctctgctagcagctgatgctc  
 agggccagaaggcttcaccaaacacgtgggctgtgcatccctggagggccagcgggtggccaacagtgtggcacggaagcatgggtt  
 ccctaacctgggccaagatcttggggactattaccacttctggcatcagaggagtacgaagcggcctctgctcaccgcccgcgga  
 cagccggctgcagagggagcctcaagtacagtggctggaacagcaggtggcaaaagcagggactaaacgggacgtgtaccaggagcc  
 cacagaccccaagttctcagcagtggtacctgtctgtgctactcagcgggacctgaatgtgaagggcggcctggcgagggctacac  
 agggcagcggcattgtggtctcattctggacgatggcatcgagaagaaccaccggacttggcaggaattatgatcctggggccagttt  
 gatgtcaatgaccaggacctgaccccaagcctcggtacacacagatgaatgacaacaggcacggcacacgggtgtcgggggaagtg  
 ctgagggtggccaacaacgggtgtctgtggtgtaggtgtggcctacaacggcggcattggaggggtgcgcatgctggatggcgaggtgaca  
 gatgcatgtggagggcacgctcgtggcctgaacccaaccacatccacatctacagtggcagctggggccccgaggatgacggcaaga  
 cagtggatggggcagccccgctcggcaggaggcccttctcgtggggttagccaggggccgaggggggctgggctccatcttgtctgg  
 gcctcggggaacggggccgggaacatgacagctgcaactgcgacggctacccaacagtatctacacgctgtccatcagcagcgcca  
 cgcatgttgcaacgtgcccgtgtacagcgggctgctcgtccacactggccacgactacagcagtggaaccagaatgagaagcag  
 atcgtgacgactgacttgcggcagaagtgcacggagtctcacagggcacctcagcctctgccccttagcagccggcatcattgctctca  
 ccctggagggccaataagaacctcacatggcgggacatgcaaacctggtggtacagacctgaagccagcccacccaatgccaacgac  
 tgggccaccaatggtgtgggcccgaagtgagccactcatatggctacgggcttttgacgcaaggcggcctggtggccctggccagaat  
 tggaccacagtgccccccagcgaagtgcacatcgacatcctaccagcccaagacatcgggaaacggctcaggtgagggaaga  
 ccgtgaccgctgctggcgagcccaaccacatcactcggctggagcagcctcagcggcggctcacctgtcctataatgcccgtggc  
 gacctggccatccactggctagccccatgggacaccgctccaccctgctggcagccagccacatgactactccgagatgggttaat  
 gactgggcttcatgacaactcattcctgggatgaggatccctctggcagtggtgcttagagattgaaaacaccagcgaagccaacaact  
 atgggacgctgaccaagttcacctcgtactctatggcaccggccctgaggggctgcccgtacctccagaagcagtggtgcaagacc  
 tcacgtccagtcaggcctgtgtggtgtgaggaaggcttccctgcaccagaagagctgtgtccagcactgcccctcaggcttgccccc  
 ccaagtctcgatagcactatagaccgagaatgacgtggagaccatccggggcagcgtctgcgccccctgccacgctcatgtgccac  
 atgcccagggggccctgacagactgctcagctgccccagccacgctcctggaccctgtggagcagactgtctcccggcaagcc  
 agagcagccgagatccccccacagcagcagccacctggctgccccggaggtggagggcggggcaacggctcggggcagggct  
 gctgccctcacactgctgaggtggtggccggcctcagctgcgcttcatcgtctgcttctcgtcactgtcttctgctcctgctgagctg  
 ctctggctttagtttgggggtgaaggtgtacacatggaccgtggcctcatctcctacaaggggctgccccctgaagcctggcaggag  
 gagtggcctgctgactcagaagaggacggggccggggcagagggaccgcttataaagaccagagcggcctctgaacgcgccg

c (SEQ ID NO: 22).

В другом варианте реализации последовательность аминокислот фурина включает следующую по-  
 следовательность аминокислот:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLN  
 LGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTRKRDVYQEPT  
 DPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGA  
 SFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGRTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRML  
 DGEVTDAVEARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDPARLAEEAFFRGVSQGRGGL  
 GSIFVWASGNNGREHDSNCNDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGN  
 QNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNL TWRDMQHLVVQTSKPA  
 HLNANDWATNGVGRKVSHSYGYLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDI  
 GKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARP  
 HDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEVWLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAPEGL  
 PVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRA  
 SVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQPPRLPPEV  
 EAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVK VYTMDRGLIS  
 YKGLPPEAWQECPDSEDEGRGERTAFIKDQSAL\* (SEQ ID NO: 23).

В одном варианте реализации термин фактор свертывания крови дополнительно включает гомолог известного фактора свертывания крови. В одном варианте реализации гомолог обладает коагулирующей активностью. В некоторых вариантах реализации, в объем термина "гомология" согласно настоящему изобретению также входят варианты с делецией, вставкой или заменой, включая замену аминокислоты, и биологически активные фрагменты полипептида. В одном варианте реализации вариант включает консервативные замены, или делеции, вставки, или замены, которые значительно не изменяют трехмерную структуру фактора свертывания крови. В другом варианте реализации делеция, вставка или замена не изменяет исследуемую функцию фактора свертывания крови, который, в одном варианте реализации связывается с определенным партнером по связыванию.

В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомолог фактора свертывания крови. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомолог фактора свертывания крови, обладающий коагулирующей активностью. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомолог фактора свертывания крови, осуществляющий функциональное связывание. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте, обладающие коагулирующей активностью. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте, осуществляющие функциональное связывание. В другом варианте реализации гомологи представляют собой, например, полипептиды, которые по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичны фактору свертывания крови, что определяют с применением программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI), применяя параметры по умолчанию.

В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фурина. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фурина, у которых сохранилась интересующая функция, которая в одном варианте реализации представляет собой расщепление белка-предшественника. В другом варианте реализации гомологи представляют собой, например, полипептиды, которые по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичны фурину, что определяют с применением программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI), применяя параметры по умолчанию.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от одного до трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР на карбоксильном конце.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от одного до пяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

Должно быть очевидно, что композиции и способы согласно настоящему изобретению, включающие компоненты или этапы, описанные в настоящем тексте, могут в другом варианте реализации состоять из тех же компонентов или этапов или в другом варианте реализации состоять по существу из тех же компонентов или этапов. В некоторых вариантах реализации, термин "включать" относится к включению указанного активного агента, такого как СТР-модифицированный фактор свертывания крови, а также к включению других активных агентов, и фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, смягчительных средств, стабилизаторов и т.д., известных в фармацевтической промышленности. В некоторых вариантах реализации, термин "состоящий по существу из" относится к композиции, в которой единственный активный ингредиент представляет собой указанный активный ингредиент, тем не менее, могут быть включены также другие соединения, которые нужны для стабилизации, консервирования и т.д. лекарственной формы, но непосредственно не участвуют в терапевтическом действии указанного активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации, термин "состоящий по существу из"







СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от четырех до девяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от четырех до десяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от пяти до шести СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от пяти до семи СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от пяти до восьми СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от пяти до девяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от пяти до десяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, на аминоконце которого нет СТР. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, у которого отсутствует СТР на аминоконце. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, содержащего по меньшей мере один СТР на карбоксильном конце и не содержащего СТР на аминоконце. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, содержащего несколько СТР на карбоксильном конце, описанного в настоящем тексте, и не содержащего СТР на аминоконце.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, описанный выше в настоящем тексте.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложен полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный фактор свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен сконструированный фактор свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте, называют СТР-модифицированным фактором свертывания крови.

В одном варианте реализации СТР, которые присоединяют к карбоксильному концу фактора свертывания крови, присоединены к карбоксильному концу последовательно.

В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентной или улучшенной биологической активностью по сравнению с не модифицированным СТР фактором свертывания крови. В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентными или улучшенными фармакологическими показателями, по сравнению с не модифицированным СТР фактором свертывания крови. В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентной или улучшенной фармакокинетикой, по сравнению с не модифицированным СТР фактором свертывания крови. В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентной или улучшенной фармакодинамикой, по сравнению с немодифицированным СТР фактором свертывания крови.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения





ного фактора свертывания крови, содержащего от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хо-рионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида фактора свертывания крови, при этом последовательность указанного СТР-модифицированного фактора свертывания крови выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 27 или 29, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта.

В некоторых вариантах реализации, в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, указанный способ включает этап подкожного введения субъекту СТР-модифицированного фактора VII, включающего от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хо-рионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVII, при этом последовательность указанного СТР-модифицированного FVII выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 27 или 29, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта.

В других вариантах реализации, сконструированный фактор свертывания крови предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В одном варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 3 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В одном варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 4 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В одном варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 5 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В другом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 2 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В другом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 1 СТР, присоединенный к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В других вариантах реализации, сконструированный фактор свертывания крови может уменьшить количество инфузий, необходимых для пациента, уменьшить необходимые для пациента дозы, или уменьшить и то и другое.

В одном варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 3 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, проявляет улучшенный ФК профиль, при этом сохраняется его коагулирующая активность по сравнению с собранным FIX-СТР-СТР, собранным FIX-СТР или rhFIX. В одном варианте реализации период полужизни rFIX-СТР3 от 2,5 до 4 раз больший, чем таковой для rFIX у крыс и у мышей, лишенных FIX. В одном варианте реализации введение rFIX-СТР<sub>3</sub> значительно продливает прокоагулирующий эффект у мышей, лишенных FIX, на по меньшей мере 76 ч. после введения. В одном варианте реализации введение rFIX-СТР<sub>3</sub> вызывает более высокий пик активности, чем у rFIX у мышей, лишенных FIX. В другом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 2 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, проявляет улучшенный ФК профиль, при этом сохраняется его коагулирующая активность по сравнению с собранным FIX-СТР или rhFIX. В другом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 2 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, обладает в 3 раза большим периодом полужизни и в 4,5 раза большей AUC по сравнению с rhFIX.

В другом варианте реализации п/к введение приводит к большей биодоступности СТР-модифицированного FVII по сравнению с рекомбинантным FVII. В другом варианте реализации период полужизни увеличивается и биодоступность (AUC п/к/AUC в/в) повышается после п/к введения FVIIa-СТР 3 и 5, по сравнению с п/к введением NovoSeven®. В другом варианте реализации инъецированный подкожно MOD-5014 и MOD-5019 показал улучшенную выживаемость мышей, по сравнению с рекомбинантным FVII (NovoSeven®) (см. пример 8, ниже).

В другом варианте реализации термины "СТР-пептид", "карбоксиконцевой пептид" и "последовательность СТР" используют взаимозаменяемо в настоящем тексте. В другом варианте реализации карбоксиконцевой пептид представляет собой полноразмерный СТР. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В другом варианте реализации к N-концу СТР присоединен сигнальный пептид, как описано в US 7553940, который полностью включен в данную заявку посредством ссылки.

В других вариантах реализации, термин "сконструированный фактор свертывания крови" относится к последовательности аминокислот созревшего фактора свертывания крови. В других вариантах реализации, термин "сконструированный фактор свертывания крови" относится к последовательности аминокислот фактора свертывания крови, включающей сигнальную последовательность или сигнальный пептид.

В другом варианте реализации термины "сигнальная последовательность" и "сигнальный пептид" используют взаимозаменяемо в настоящем тексте. В другом варианте реализации термин "последовательность", при описании полинуклеотидной молекулы, может относиться к кодирующей части. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, описанный в настоящем тексте, обладает повышенной биологической активностью *in vivo*, по сравнению с тем же фактором свертывания крови без по меньшей мере одного СТР. В

одном варианте реализации повышенная биологическая активность обуславливается большим периодом полужизни сконструированного фактора свертывания крови, при этом сохраняется по меньшей мере часть биологической активности. В другом варианте реализации повышенная биологическая активность обуславливается повышенной биологической активностью, возникшей в результате модификации СТР. В другом варианте реализации повышенная биологическая активность обуславливается как большим периодом полужизни, так и повышенными функциональными возможностями СТР-модифицированного фактора свертывания крови.

В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышенную защиту от деградации фактора свертывания крови. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышенную защиту от клиренса. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает увеличенное время клиренса. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови увеличивает  $C_{max}$ . В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови увеличивает  $T_{max}$ . В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови увеличивает время полужизни ( $T_{1/2}$ ).

В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют таким же способом, что и немодифицированный конъюгированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению обладает большим периодом полужизни из кровообращения и временем удерживания в плазме, пониженным клиренсом и повышенной клинической активностью *in vivo*. В другом варианте реализации благодаря улучшенным свойствам конъюгированного фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте, данный конъюгат вводят с меньшей частотой, чем немодифицированную форму того же фактора свертывания крови.

В другом варианте реализации уменьшение частоты введения приведет к улучшенной стратегии лечения, которая, в одном варианте реализации приведет к улучшению исполнительности пациента, что приведет к улучшению результатов лечения, а также к улучшению качества жизни пациента. В другом варианте реализации по сравнению с обычными конъюгатами факторов свертывания крови, было обнаружено, что конъюгаты, обладающие молекулярной массой и структурой линкера, как у конъюгатов согласно настоящему изобретению, обладают повышенной эффективностью, повышенной стабильностью, повышенными уровнями АУС и увеличенным периодом полужизни из кровообращения.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора IX (FIX), состоящий из полипептида FIX и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного СТР-модифицированного полипептида FIX.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложена композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте. В одном варианте реализации терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови определяют в соответствии с такими факторами, как конкретное состояние, от которого лечат, общее состояние пациента, которого лечат, а также другие ингредиенты в указанной композиции.

В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для профилактического лечения гемофилии, таким образом снижая риск кровотечения и сопутствующих осложнений. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии, при этом снижая риск выработки ингибирующих антител на экзогенно введенные факторы свертывания крови. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии, таким образом стимулируя гомеостаз.

В одном варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют в терапевтических целях. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют в профилакти-

ческих целях.

В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, подверженных избыточному кровотечению или ушибам, или имеющих пролонгированное протромбиновое время (ПТВ) или частичное тромбопластиновое время (ЧТВ). В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, имеющих приобретенное состояние, которое вызывает кровотечение, такое как дефицит витамина К или заболевание печени. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, имеющих недостаточность факторов свертывания крови, которая является приобретенной (в результате других заболеваний) или наследственной, легкой или тяжелой, постоянной или временной. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии А. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии В. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, имеющих приобретенную недостаточность вследствие хронических заболеваний, таких как заболевание печени или рак; вследствие острого состояния, такого как диссеминированная внутрисосудистая коагуляция крови (ДВК), при которой с большой скоростью расходуются факторы свертывания крови; или вследствие дефицита витамина К или лечения антагонистом витамина К, таким как варфарин (для продукции факторов II, VII, IX и X требуется витамин К). В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от заболевания, которое вызывает дисбаланс свертывания крови, такого как, но не ограничиваясь перечисленными: заболевание печени, уремия, рак, нарушение костного мозга, воздействие змеиного яда, дефицит витамина К, антикоагуляционная терапия, случайный прием внутрь антикоагулянта варфарина, множественные переливания крови (единицы крови при хранении теряют некоторое количество факторов свертывания крови) или комбинация перечисленных. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения тромбоза глубоких вен у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения неконтролируемого кровотечения у субъекта с гемофилией, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения эпизодов кровотечения у субъекта с гемофилией, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ контроля эпизодов кровотечения у субъекта с гемофилией В (врожденным дефицитом фактора IX).

В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению предназначены для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией А или В с помощью ингибиторов FVIII или FIX и у пациентов с приобретенной гемофилией; предотвращения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных процедурах у пациентов с гемофилией А или В с помощью ингибиторов FVIII или FIX и у пациентов с приобретенной гемофилией; лечения эпизодов кровотечения у пациентов с врожденной недостаточностью FVII и предотвращения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных процедурах у пациентов с врожденной недостаточностью FVII. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению предназначены для лечения или предотвращения мышечных кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению предназначены для лечения или предотвращения суставных кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение носового кровотечения и кровоточивости десен, кровотечения из слизистой оболочки, кровотечения в пределах центральной нервной системы. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение кровотечения желудочно-кишечного тракта или мозгового кровотечения. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редких легких кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редких умеренных кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редких умеренных кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение частых легких кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение частых умеренных кровотечений.

В одном варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение бессимптомной гемофилии. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение легкой - умеренной гемофилии. В другом варианте реализации компози-

ции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение тяжелой гемофилии.

В одном варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение кровоизлияния, которое представляет собой в одном варианте реализации некупируемое кровотечение и в другом варианте реализации внутримозговое кровоизлияние. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению применяют для терапевтического или профилактического лечения коагулопатии новорожденных; тяжелого заболевания печени; для хирургических процедур с высокой степенью риска; травматической потери крови; для трансплантации костного мозга; тромбоцитопений и нарушения функции тромбоцитов; для неотложного ингибирования действия пероральных антикоагулянтов; врожденных дефицитов факторов V, VII, X и XI; или болезни фон Виллебранда, в одном варианте реализации для терапевтического или профилактического лечения болезни фон Виллебранда с помощью ингибиторов фактора фон Виллебранда.

В одном варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют для лечения у субъекта гемофилии или сопутствующего заболевания, описанного в настоящем тексте. В одном варианте реализации субъект представляет собой человека. В другом варианте реализации субъект представляет собой одомашненное животное. В другом варианте реализации субъект представляет собой млекопитающее. В другом варианте реализации субъект представляет собой сельскохозяйственное животное. В другом варианте реализации субъект представляет собой обезьяну. В другом варианте реализации субъект представляет собой лошадь. В другом варианте реализации субъект представляет собой корову. В другом варианте реализации субъект представляет собой мышь. В другом варианте реализации субъект представляет собой крысу. В другом варианте реализации субъект представляет собой животное из семейства псовых. В другом варианте реализации субъект представляет собой животное из семейства кошачьих. В другом варианте реализации субъект представляет собой животное из семейства бычьих, овечьих, свиных, лошадиных, мышинных или оленьих. В одном варианте реализации субъект представляет собой мужчину. В другом варианте реализации субъект представляет собой женщину. В одном варианте реализации субъект представляет собой ребенка, в другом варианте реализации подростка, в другом варианте реализации взрослого или, в другом варианте реализации пожилого субъекта. В другом варианте реализации субъект представляет собой пациента детского возраста, в другом варианте реализации пациента старческого возраста.

В другом варианте реализации "(СТР)<sub>n>1</sub>-фактор свертывания крови", описанный в настоящем тексте, включает полноразмерный фактор свертывания крови или его активный фрагмент, соединенный посредством пептидной связи на карбоксильном конце по меньшей мере с одной молекулой СТР, при этом на его аминоконце отсутствуют СТР. В другом варианте реализации "(СТР)<sub>n>1</sub>-фактор свертывания крови", описанный в настоящем тексте, включает фактор свертывания крови или его активный фрагмент, соединенный посредством пептидной связи с по меньшей мере одной молекулой СТР, которая соединена с дополнительной молекулой СТР посредством пептидной связи, при этом на его аминоконце отсутствуют СТР. В другом варианте реализации одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует сконструированный фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к его С-концу, и не содержащий СТР на аминоконце.

В другом варианте реализации СТР присоединен к фактору свертывания крови посредством линкера. В другом варианте реализации линкер, который соединяет последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой ковалентную связь. В другом варианте реализации линкер, который соединяет последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой пептидную связь. В другом варианте реализации линкер, который соединяет последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой замещенную пептидную связь. В другом варианте реализации последовательность СТР включает: DPRFQDSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 1). В другом варианте реализации последовательность СТР включает: SSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2). В другом варианте реализации последовательность СТР включает последовательность аминокислот, выбранную из последовательностей, описанных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

В другом варианте реализации карбоксиконцевой пептид (СТР) согласно настоящему изобретению включает последовательность аминокислот хорионического гонадотропина человека от положения аминокислоты 112 до положения 145, описанную в последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает последовательность аминокислот хорионического гонадотропина человека от положения аминокислоты 118 до положения 145, описанную в последовательности SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации последовательность СТР также начинается от любого положения между положениями 112-118 и заканчивается в положении 145 последовательности аминокислот хорионического гонадотропина человека. В некоторых вариантах реализации, последовательность пептида СТР имеет длину 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислоты и начинается от положения 112, 113, 114, 115, 116, 117 или 118 последовательности аминокислот СТР.

В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 1-5 консервативных замен аминокислот, как описано



рианте реализации 3 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 4 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 5 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 2 или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации все последовательности аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере один сайт гликозилирования. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает 2 сайта гликозилирования. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает 3 сайта гликозилирования. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает 4 сайта гликозилирования. В одном варианте реализации одна или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина полностью гликозилирована. В другом варианте реализации одна или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина частично гликозилирована. В одном варианте реализации частичное гликозилирование означает, что один из сайтов гликозилирования СТР гликозилирован. В другом варианте реализации два из сайтов гликозилирования СТР гликозилированы. В другом варианте реализации три из сайтов гликозилирования СТР гликозилированы.

В некоторых вариантах реализации, модификация последовательности СТР обеспечивает преимущество, позволяя применять меньшие дозировки. В некоторых вариантах реализации, модификация последовательностей СТР обеспечивает преимущество, позволяя применять меньшее количество дозровок. В некоторых вариантах реализации, модификация последовательностей СТР обеспечивает преимущество, позволяя оказывать безопасное, пролонгированное действие.

В некоторых вариантах реализации, в настоящем тексте в объем термина "полипептид", "сконструированный фактор свертывания крови" или "белок" входят нативные полипептиды (либо продукты деградации, либо искусственно синтезированные полипептиды, либо рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (обычно, искусственно синтезированные полипептиды), а также пептоиды и полупептоиды, которые представляют собой аналоги полипептидов, которые, в некоторых вариантах реализации, содержат модификации, которые делают полипептиды, включающие фактор свертывания крови, еще более стабильными при нахождении в организме или способными лучше проникать в клетки.

В некоторых вариантах реализации, модификации включают, но не ограничены перечисленными, модификацию С-конца, модификацию полипептидной связи, включая, но не ограничиваясь перечисленными:  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S=O}$ ,  $\text{O=C-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{S=C-NH}$ ,  $\text{CH=CH}$  или  $\text{CF=CH}$ , модификации остова и модификацию остатков. Способы получения пептидомиметических соединений хорошо известны в данной области и подробно описаны, например, в Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., глава 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), которая включена посредством ссылки, как если бы она была полностью описана в настоящем тексте. Дополнительные подробности в этом отношении описаны ниже в настоящем тексте.

В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи ( $\text{-CO-NH-}$ ) внутри полипептида содержат заместители. В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены N-метилованными связями ( $\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены сложноэфирными связями ( $\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены кетометиленовыми связями ( $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены альфа-азо-связями ( $\text{-NH-N(R)-CO-}$ ), где R представляет собой любой алкил, например метил, карбо-связями ( $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены гидроксметиленовыми связями ( $\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены тиамидными связями ( $\text{-CS-NH-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены этиленовыми двойными связями ( $\text{-CH=CH-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены ретроамидными связями ( $\text{-NH-CO-}$ ). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены производными полипептида ( $\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$ ), где R представляет собой "нормальную" боковую цепь, естественно присутствующую у атома углерода. В некоторых вариантах реализации, данные модификации могут быть осуществлены по любым связям вдоль пептидной цепи и, в одном варианте реализации по нескольким (2-3 связям) одновременно.

В некоторых вариантах реализации, природные ароматические аминокислоты полипептида, такие как Trp, Tug и Phe, замещены на синтетические неприродные кислоты, такие как фенилглицин, ПИС, нафтилеланин (Nol), метилированные по кольцу производные Phe, галогенированные производные Phe или о-метил-Туг. В некоторых вариантах реализации, полипептиды согласно настоящему изобретению включают одну или более модифицированных аминокислот или один или более не относящихся к аминокислотам мономеров (например, жирную кислоту, сложные углеводы, и т.д.).

В одном варианте реализации предполагают, что термин "аминокислота" или "последовательность аминокислот" включает 20 встречающихся в природе аминокислот; такие аминокислоты часто оказываются посттрансляционно модифицированными *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин

и фосфотреонин; и другие необычные аминокислоты включают, но не ограничены перечисленными: 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин. В одном варианте реализации "аминокислота" включает как D-, так и L-аминокислоты.

В некоторых вариантах реализации, полипептиды согласно настоящему изобретению применяют для получения лекарственного средства, в котором полипептиды, включающие фактор свертывания крови, должны находиться в растворимой форме. В некоторых вариантах реализации, полипептиды согласно настоящему изобретению включают одну или более не природных или природных полярных аминокислот, включая, но не ограничиваясь перечисленными, серин и треонин, которые способны повышать растворимость полипептида благодаря их боковым цепям, содержащим гидроксил.

В некоторых вариантах реализации, сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют в линейной форме, хотя для специалиста в данной области должно быть очевидно, что в случаях, когда циклизация сильно не препятствует свойствам сконструированных факторов свертывания крови, также можно применять циклические формы сконструированных факторов свертывания крови.

В некоторых вариантах реализации, сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению синтезируют биохимическим способом, например, применяя стандартные твердофазные методики. В некоторых вариантах реализации, данные биохимические способы включают исключительно твердофазный синтез, частично твердофазный синтез, конденсацию фрагментов или классический синтез в растворе.

В некоторых вариантах реализации, методики рекомбинантного белка применяют для получения сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, методики рекомбинантного белка применяют для получения относительно длинных полипептидов (например, состоящих из более чем 18-25 аминокислот). В некоторых вариантах реализации, методики рекомбинантного белка применяют для получения больших количеств сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, рекомбинантные методики описаны у Bitter и др., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier и др. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson и др. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu и др. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi и др. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 и Brogli и др., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley и др. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 и Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, раздел VIII, стр. 421-463, которые полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена полинуклеотидная молекула, включающая кодирующую часть гена, кодирующего полипептид, включающий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена полинуклеотидная молекула, состоящая из кодирующей части гена, кодирующего полипептид, включающий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена полинуклеотидная молекула, состоящая по существу из кодирующей части гена, кодирующего полипептид, включающий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В одном варианте реализации полинуклеотид представляет собой полинуклеотидную последовательность. В одном варианте реализации полинуклеотид представляет собой полинуклеотидную молекулу.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотидную молекулу, описанную в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, при-

соединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая клетку, описанную в настоящем тексте. В другом варианте реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. В другом варианте реализации клетка представляет собой прокариотическую клетку.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, что позволяет получить СТР-модифицированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти полинуклеотидных последовательностей, кодирующих карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, к карбоксильному концу полинуклеотидной последовательности, кодирующей указанный фактор свертывания крови, что позволяет получить СТР-модифицированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FVIIa.

В другом варианте реализации сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению синтезируют, применяя полинуклеотидную молекулу, кодирующую полипептид согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, полинуклеотидную молекулу, кодирующую сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению, лигируют в вектор экспрессии, включающий транскрипционный контроль с помощью цис-регуляторной последовательности (например, промоторной последовательности). В некоторых вариантах реализации, цис-регуляторная последовательность подходит для контролирования конститутивной экспрессии сконструированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, цис-регуляторная последовательность подходит для контролирования тканеспецифичной экспрессии сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, цис-регуляторная последовательность подходит для контролирования индуцируемой экспрессии сконструированных факторов свертывания крови согласно изобретению.

В некотором варианте реализации тканеспецифичные промоторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают последовательности, которые функционируют в одной или более конкретных популяциях клеток. Примеры включают, но не ограничены перечисленными, такие промоторы, как промотор альбумина, который специфичен для печени (Pinkert и др., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), специфичные для лимфоидных клеток промоторы (Calame и др., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275); в частности, промоторы Т-клеточных рецепторов (Winoto и др., (1989) *EMBO J.* 8:729-733) и промоторы иммуноглобулинов (Banerji и др. (1983) *Cell* 33729-740), специфичные для нервных клеток промоторы, такие как промотор нейрофиламента (Butne и др. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), специфичные для поджелудочной железы промоторы (Edlunch и др. (1985) *Science* 230:912-916) или специфичные для молочной железы промоторы, такие как промотор молочной сыворотки (патент США номер

4873316 и европейская заявка на патент, номер публикации 264166). Индуцируемые промоторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают, например, индуцируемый тетрациклином промотор (Stour, M.A., и др., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).

В одном варианте реализации формулировка "полинуклеотидная молекула" относится к одно- или двунитевой последовательности нуклеиновых кислот, которую выделяют и предоставляют в виде последовательности РНК, комплементарной полинуклеотидной последовательности (кДНК), геномной полинуклеотидной последовательности и/или комбинированных полинуклеотидных последовательностей (например, комбинации описанных выше последовательностей).

В одном варианте реализации "комплементарная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которую получают путем обратной транскрипции матричной РНК, применяя обратную транскриптазу или любую другую РНК-зависимую ДНК полимеразу. В одном варианте реализации последовательность можно впоследствии амплифицировать *in vivo* или *in vitro*, применяя ДНК-полимеразу. В одном варианте реализации "геномная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, полученной (выделенной) из хромосомы и, таким образом, она представляет собой непрерывный участок хромосомы.

В одном варианте реализации "комбинированная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая является по меньшей мере частично комплементарной и по меньшей мере частично геномной. В одном варианте реализации комбинированная последовательность может включать некоторые экзонные последовательности, необходимые для кодирования полипептида согласно настоящему изобретению, а также некоторые интронные последовательности, вставленные между ними. В одном варианте реализации интронные последовательности могут быть получены из любого источника, включая другие гены, и, как правило, будут включать консервативные сигнальные последовательности сплайсинга. В одном варианте реализации интронные последовательности включают действующие в *cis*-положении регуляторные компоненты экспрессии.

В одном варианте реализации после экспрессии и секреции, сигнальные пептиды отщепляются от сконструированных предшественников факторов свертывания крови, в результате чего получают зрелые сконструированные факторы свертывания крови.

В некоторых вариантах реализации, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению получают, применяя методики ПЦР, или любой другой способ или процедуру, известную специалисту в данной области. В некоторых вариантах реализации, процедура включает лигирование двух различных последовательностей ДНК (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", ред. Ausubel и др., John Wiley & Sons, 1992).

В одном варианте реализации полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, которые кодируют сконструированные факторы свертывания крови, встроены в векторы экспрессии (т.е., конструкции нуклеиновых кислот), чтобы позволить экспрессию рекомбинантного полипептида. В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает дополнительные последовательности, которые делают данный вектор подходящим для репликации и встраивания в прокариотов. В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает дополнительные последовательности, которые делают данный вектор подходящим для репликации и встраивания в эукариотов. В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает челночный вектор, который делает данный вектор подходящим для репликации и встраивания как в прокариотов, так и в эукариотов. В некоторых вариантах реализации, векторы для клонирования включают последовательности инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

В одном варианте реализации множество прокариотических или эукариотических клеток можно применять в качестве хозяев для систем экспрессии для экспрессии факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, данные хозяева включают, но не ограничены перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным вектором экспрессии ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, включающими кодирующую полипептид последовательность; дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, включающими кодирующую полипептид последовательность; системы клеток растения, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии, такими как плаزمида T<sub>i</sub>, включающими кодирующую полипептид последовательность.

В некоторых вариантах реализации, для экспрессии факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют небактериальные системы экспрессии (например, системы экспрессии млекопитающих, такие как клетки CHO). В одном варианте реализации вектор экспрессии, который применяют для экспрессии полинуклеотидов согласно настоящему изобретению в клетках млекопитающих, представляет собой вектор pCI-dhfr, включающий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину. Конструирование вектора pCI-dhfr описано, согласно одному варианту реализации, в примере 1.

В некоторых вариантах реализации, в бактериальных системах согласно настоящему изобретению,

можно успешно выбрать множество векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого полипептида. В одном варианте реализации желательны получить большие количества полипептида. В одном варианте реализации желательны векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней белкового продукта, возможно соединенного с гидрофобной сигнальной последовательностью, которая направляет экспрессированный продукт в периплазму бактерий или культуральную среду, из которой белковый продукт легко очистить. В одном варианте реализации некоторые слитые белки сконструированы таким образом, что они содержат специфичный сайт расщепления, чтобы облегчить получение полипептида. В одном варианте реализации векторы, поддающиеся такой манипуляции, включают, но не ограничены перечисленными, векторы экспрессии в *E. coli* серии pET (Studier и др., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)).

В одном варианте реализации применяют дрожжевые системы экспрессии. В одном варианте реализации множество векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, можно применять в дрожжах, как описано в заявке на патент США номер 5932447, которая полностью включена в данную заявку посредством ссылки. В другом варианте реализации применяют векторы, которые способны встраиванию чужеродных последовательностей ДНК в дрожжевую хромосому.

В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые позволяют, например, транслировать несколько белков с одной мРНК, такие как участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и последовательности для встраивания в геном полипептида с химерным промотором.

В некоторых вариантах реализации, векторы экспрессии млекопитающих включают, но не ограничены перечисленными, pcDNA3, pcDNA3,1 (+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3,1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, которые доступны для приобретения у Invitrogen, pCI, который доступен для приобретения у Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV и pBK-CMV, которые доступны для приобретения у Stratagene, pTRES, который доступен для приобретения у Clontech, и их производные.

В некоторых вариантах реализации, в настоящем изобретении применяют векторы экспрессии, включающие регуляторные компоненты из эукариотических вирусов, таких как ретровирусы. Векторы SV40 включают pSVT7 и pMT2. В некоторых вариантах реализации, векторы, полученные из вируса папилломы крупного рогатого скота, включают pBV-1MTHA и векторы, полученные из вируса Эпштейна-Барр, включают pHEBO и p2O5. Другие примеры векторов включают pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, бакуловирусный pDSVE и любой другой вектор, позволяющий экспрессию белков под контролем раннего промотора SV-40, позднего промотора SV-40, промотора металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши, промотора вируса саркомы Рауса, промотора полиэдрина или других промоторов, которые эффективны для экспрессии в эукариотических клетках.

В некоторых вариантах реализации, рекомбинантные вирусные векторы полезны для экспрессии *in vivo* факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению, поскольку они дают такие преимущества, как латеральная инфекция и специфичность нацеливания. В одном варианте реализации латеральная инфекция заложена в жизненном цикле, например, ретровируса, и представляет собой процесс, с помощью которого единственная инфицированная клетка продуцирует множество поколений вирионов, которые отпочковываются и заражают соседние клетки. В одном варианте реализации это приводит к тому, что быстро становится инфицированной большая область, большая часть которой не была изначально инфицирована исходными вирусными частицами. В одном варианте реализации получают вирусные векторы, которые не способны распространяться латерально. В одном варианте реализации данное свойство может быть полезно, если желательной целью является введение определенного гена лишь в ограниченное количество целевых клеток.

В одном варианте реализации для введения вектора экспрессии согласно настоящему изобретению в клетки можно применять различные способы. Такие способы в общих чертах описаны в Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Нью-Йорк (1989, 1992), в Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Балтимор, Мэриленд (1989), Chang и др., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega и др., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa и др. (*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986), и включают, например, стабильную или временную трансфекцию, липофекцию, электропорацию и инфекцию рекомбинантными вирусными векторами. Кроме того, описание способов положительной-отрицательной селекции см. в патентах США с номерами 5464764 и 5487992, включенных в данную заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации, введение нуклеиновой кислоты путем вирусной инфекции дает несколько преимуществ над другими способами, такими как липофекция и электропорация, поскольку вследствие инфекционной природы вирусов можно добиться более эффективной трансфекции.

В одном варианте реализации должно быть очевидно, что сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению также можно экспрессировать с конструкции нуклеиновой кислоты, которую вводят индивиду, используя любой подходящий способ введения, описанный выше в настоящем тексте (т.е. генотерапия *in vivo*). В одном варианте реализации конструкцию нуклеиновой

кислоты вводят в подходящую клетку с помощью подходящего носителя/способа доставки генов (трансфекции, трансдукции, гомологичной рекомбинации и т.д.) и системы экспрессии, при необходимости, а затем модифицированные клетки растят в культуре и возвращают в индивида (т.е. генотерапия *ex vivo*).

В одном варианте реализации применяют векторы экспрессии в растениях. В одном варианте реализации экспрессия последовательности, кодирующей полипептид, запускается множеством промоторов. В некоторых вариантах реализации, применяют вирусные промоторы, такие как промоторы 35S РНК и 19S РНК СаMV (Brisson и др., *Nature* 310:511-514 (1984)), или промотор белка оболочки TMV (Takamatsu и др., *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). В другом варианте реализации применяют промоторы растений, такие как, например, малая субъединица RUBISCO (Coruzzi и др., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); и Brogli и др., *Science* 224:838-843 (1984)), или промоторы белков теплового шока, например, hsp17.5-E или hsp17.3-B сои (Gurley и др., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)). В одном варианте реализации конструкции вводят в клетки растений, применяя плазмиду Ti, плазмиду Ri, вирусные векторы растений, прямую трансформацию ДНК, микроинъекцию, электропорацию и другие методики, хорошо известные квалифицированному специалисту. См., например, Weissbach & Weissbach (*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, раздел VIII, стр. 421-463 (1988)). Другие системы экспрессии, такие как системы клеточек-хозяев насекомых и млекопитающих, которые хорошо известны в данной области, также можно применять в настоящем изобретении.

Должно быть очевидно, что кроме необходимых компонентов для транскрипции и трансляции внедренной кодирующей последовательности (кодирующей указанный полипептид), экспрессионная конструкция согласно настоящему изобретению также может включать последовательности, сконструированные для оптимизации стабильности, продукции, очистки, выхода или активности экспрессируемого полипептида.

В некоторых вариантах реализации, трансформированные клетки культивируют при эффективных условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии больших количеств рекомбинантных сконструированных факторов свертывания крови. В некоторых вариантах реализации, эффективные условия культивирования включают, но не ограничены перечисленными, эффективные среды, биореактор, температуру, pH и кислородные условия, которые позволяют продуцировать белок. В одном варианте реализации эффективная среда относится к любой среде, в которой культивируют клетку с получением рекомбинантного полипептида согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, среда обычно включает водный раствор, содержащий усваиваемые источники углерода, азота и фосфата и подходящие соли, минеральные вещества, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. В некоторых вариантах реализации, клетки согласно настоящему изобретению можно культивировать в обычных ферментационных биореакторах, встряхиваемых колбах, пробирках, микротитрационных чашках и чашках Петри. В некоторых вариантах реализации, культивирование осуществляют при температуре, pH и содержании кислорода, подходящих для рекомбинантной клетки. В некоторых вариантах реализации, определение условий культивирования находится в рамках компетенции среднего специалиста в данной области.

В некоторых вариантах реализации, в зависимости от вектора и системы хозяина, используемого для продукции, полученные сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению либо остаются в рекомбинантной клетке, секретируются в ферментационную среду, секретируются в пространство между двумя клеточными мембранами, такое как периплазматическое пространство у *E.coli*; либо удерживаются на внешней поверхности клетки или вирусной мембране.

В одном варианте реализации после заранее определенного времени культивирования, осуществляют получение рекомбинантного сконструированного фактора свертывания крови.

В одном варианте реализации формулировка "получение рекомбинантного сконструированного фактора свертывания крови", используемая в настоящем тексте, относится к сбору цельной ферментационной среды, содержащей полипептид, и не обязательно предполагает дополнительные этапы выделения или очистки.

В одном варианте реализации сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению очищают, применяя множество стандартных методик очистки белка, таких как, не ограничиваясь перечисленными, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, фильтрация, электрофорез, хроматография гидрофобных взаимодействий, гельфильтрационная хроматография, обращенно-фазовая хроматография, хроматография на конканавалине А, хроматофокусирование и дифференциальное растворение.

В одном варианте реализации чтобы облегчить получение, экспрессированную кодирующую последовательность можно разработать таким образом, чтобы она кодировала сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению, слитый с отщепляемой молекулой. В одном варианте реализации слитый белок можно разработать таким образом, чтобы полипептид можно было легко выделить с помощью аффинной хроматографии; например, путем иммобилизации на колонке, специфично связывающей отщепляемую молекулу. В одном варианте реализации между сконструированным фактором свертывания крови и отщепляемой молекулой разрабатывают сайт расщепления, и полипептид можно высвободить из хроматографической колонки путем обработки подходящим ферментом или аген-

том, который специфично отщепляет слитый белок в данном сайте (см., например, Booth и др., *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); и Gardella и др., *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)).

В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению получают в "по существу чистой" форме.

В одном варианте реализации формулировка "по существу чистый" относится к чистоте, которая обеспечивает возможность эффективного использования данного белка в применениях, описанных в настоящем тексте.

В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению также можно синтезировать, применяя системы экспрессии *in vitro*. В одном варианте реализации способы синтеза *in vitro* хорошо известны в данной области и компоненты данной системы доступны для приобретения.

В некоторых вариантах реализации, рекомбинантные сконструированные факторы свертывания крови синтезируют и очищают; их терапевтическую эффективность можно проанализировать либо *in vivo*, либо *in vitro*. В одном варианте реализации активности связывания рекомбинантных сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению можно установить, применяя различные анализы, известные специалисту в данной области.

В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать индивиду сам по себе. В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать индивиду в составе фармацевтической композиции, в которой он смешан с фармацевтически приемлемым носителем.

В другом варианте реализации "фармацевтическая композиция" относится к препарату одного или более активных ингредиентов, описанных в настоящем тексте, с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Целью получения фармацевтической композиции является облегчение введения соединения в организм.

В другом варианте реализации "активный ингредиент" относится к интересующей полипептидной последовательности, которая отвечает за биологический эффект.

В другом варианте реализации любая из композиций согласно настоящему изобретению будет содержать по меньшей мере одну последовательность СТР, связанную только с карбоксильным концом интересующего сконструированного фактора свертывания крови, в любой форме. В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложены комбинированные лекарственные средства. В одном варианте реализации "комбинированное лекарственное средство" означает, главным образом, "набор из частей" в том смысле, что комбинированные компоненты, описанные выше, можно дозировать независимо или путем применения различных заданных комбинаций с различными количествами комбинированных компонентов, т.е. одновременно, параллельно, отдельно или последовательно. В некоторых вариантах реализации, части указанного набора из частей затем можно, например, вводить одновременно или с разнесением во времени, а именно, в различные моменты времени и с равными или различными интервалами времени для любой части набора из частей. Соотношение суммарных количеств комбинированных компонентов, в некоторых вариантах реализации, можно вводить в виде комбинированного лекарственного средства. В одном варианте реализации комбинированное лекарственное средство можно изменять, например, чтобы удовлетворить нуждам субпопуляции пациентов, которых нужно лечить, или нуждам одного пациента, который может нуждаться в отличном лекарственном средстве вследствие конкретного заболевания, тяжести заболевания, возраста, пола или массы тела, что может легко осуществить специалист в данной области.

В другом варианте реализации формулировки "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые используются взаимозаменяемо, относятся к носителю или разбавителю, который не вызывает существенного раздражения в организме и не нарушает биологическую активность и свойства вводимого соединения. Данные формулировки включают адьювант. В одном варианте реализации один из ингредиентов, включенных в фармацевтически приемлемый носитель, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), биосовместимый полимер с широким диапазоном растворимости как в органических, так и в водных средах (Mutter и др. (1979)).

В другом варианте реализации "вспомогательное вещество" относится к инертному веществу, которое добавляют в фармацевтическую композицию, чтобы дополнительно способствовать введению активного ингредиента. В одном варианте реализации вспомогательные вещества включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

Методики получения и введения лекарственных средств можно найти в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, последнее издание, которое включено в данную заявку посредством ссылки.

В настоящем изобретении предполагаются различные варианты реализации диапазонов доз. Дозировка сконструированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, в одном варианте реализации находится в диапазоне 0,005-100 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,005-5 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне



вания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,01 мг до 0,3 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,2 мг до 0,6 мг. В другом варианте реализации на N-конце фактора свертывания крови отсутствуют СТР.

В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 1-100 мкг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 10-80 мкг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 20-60 мкг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 10-50 мкг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 40-80 мкг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 10-30 мкг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 30-60 мкг.

В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,2 мг до 2 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 2 мг до 6 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 4 мг до 10 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 5 мг до 15 мг.

В одном варианте реализации дозировка СТР-модифицированного FIX включает 50% от количества FIX, вводимого пациентам в течение того же периода времени в рекомендуемой дозировке рекомбинантного FIX (например, Benefix®, Wyeth или Mononine®, CSL Behring). В одном варианте реализации дозировка СТР-модифицированного FVIIa включает 50% от количества FVIIa, вводимого пациентам в течение того же периода времени в рекомендуемой дозировке рекомбинантного FVIIa (например, NovoSeven®). В одном варианте реализации дозировка СТР-модифицированного FVII включает 50% от количества FVII, вводимого пациентам в течение того же периода времени в рекомендуемой дозировке рекомбинантного FVII. Например, если NovoSeven® дают пациенту до или после операции в дозе, равной 90 мкг/кг, каждые два ч (т.е. 7,65 мг каждые два ч или 45,9 мг шестью дозами в течение 12 ч, для пациента массой 85 кг), СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать в дозе, которая составляет 50% от 12-часовой дозы рекомбинантного FVIIa для данного пациента (т.е. в дозе 23 мг, которую дают однократно в течение 12 ч).

В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 45% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 10% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 25% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 35% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 75% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 100% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. Тем не менее, даже если дозировка включает такое же количество фактора свертывания крови (например, FIX), как и количество не модифицированного СТР фактора свертывания крови, она все же предпочтительна для субъектов, так как ее будут вводить реже благодаря увеличенному периоду полужизни по сравнению с рекомбинантными факторами свертывания крови.

В другом варианте реализации терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови находится в диапазоне 50-500 МЕ на кг массы тела, и его вводят от одного раза в день до одного раза в неделю для FIX или 10-500 мкг/кг для FVIIa. В другом варианте реализации терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови составляет 150-250 МЕ на кг массы тела, и его вводят раз в день. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция,

содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, составлена с такой дозой, которая эффективна для введения пациенту - человеку с помощью различных способов.

В одном варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 20-30 МЕ/дл. В другом варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 25-50 МЕ/дл. В другом варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 50-100 МЕ/дл. В другом варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 100-200 МЕ/дл. В другом варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 10-50 МЕ/дл. В другом варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 20-100 МЕ/дл.

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

В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в три дня. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в четыре дня. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в пять дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в шесть дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 7-14 дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 10-20 дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 5-15 дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 15-30 дней.

В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают повышение исполнительности пациента в отношении применения терапии фактором свертывания крови, включающей введение субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, включающего фактор свертывания крови и по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым повышая исполнительность пациента в отношении применения терапии фактором свертывания крови.

В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают повышение исполнительности пациентов, страдающих от хронических заболеваний, которые нуждаются в терапии фактором свертывания крови. В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению позволяют уменьшить частоту введения фактора свертывания крови путем модификации СТР фактора свертывания крови, описанной выше в настоящем тексте.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации термин "исполнительность" включает соблюдение указаний. В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают повышение исполнительности пациентов, нуждающихся в терапии фактором свертывания крови, путем уменьшения частоты введения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются благодаря модификации СТР, которая делает СТР-модифицированный фактор свертывания крови более стабильным. В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются в результате увеличения  $T_{1/2}$  фактора свертывания крови. В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются в результате увеличения времени клиренса или уменьшения скорости выведения фактора свертывания крови.



карбоксылному концу фактора свертывания крови, что обеспечивает предотвращение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении показали, что композиции, предложенные в настоящем тексте, неожиданно более эффективно всасывались в кровоток после п/к введения (см. примеры 7-9 в настоящем тексте). Возможность подкожного введения FVIIa является преимуществом, так как его можно использовать для профилактических применений. Подкожные инъекции пациентам также гораздо легче вводить самим себе, и это является преимуществом, когда пациенты очень молоды и их вены малы, и их трудно обнаружить.

В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксылному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта.

Пероральное введение в одном варианте реализации включает стандартную лекарственную форму, включающую таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания, жевательные таблетки, суспензии, эмульсии и тому подобные формы. Такие стандартные лекарственные формы включают безопасное и эффективное количество желательного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, каждое из которых представляет собой один вариант реализации, от приблизительно 0,7 или 3,5 мг до приблизительно 280 мг/70 кг или, в другом варианте реализации от приблизительно 0,5 или 10 мг до приблизительно 210 мг/70 кг. Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения стандартных лекарственных форм для перорального введения, хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах реализации, таблетки, как правило, включают обычные фармацевтически совместимые адъюванты, такие как инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, маннит, лактоза и целлюлоза; связующие вещества, такие как крахмал, желатин и сахароза; разрыхлители, такие как крахмал, альгиновая кислота и кроскармеллоза; лубриканты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. В одном варианте реализации можно применять скользящие вещества, такие как диоксид кремния, для улучшения свойств текучести порошкообразной смеси. В одном варианте реализации для лучшего внешнего вида можно добавлять красители, такие как красители FD&C. Подсластители и ароматизирующие агенты, такие как аспартам, сахарин, ментол, перечная мята и фруктовые вкусоароматические добавки, представляют собой полезные адъюванты для жевательных таблеток. Капсулы обычно содержат один или более твердых разбавителей, описанных выше. В некоторых вариантах реализации, выбор компонентов носителя зависит от вторичных факторов, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не являются критичными для целей настоящего изобретения, и специалист в данной

области может легко сделать такой выбор.

В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма включает заранее заданный профиль высвобождения. В другом варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки пролонгированного высвобождения. В другом варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки замедленного высвобождения. В другом варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки немедленного высвобождения. В другом варианте реализации пероральная лекарственная форма составлена с учетом желательного профиля высвобождения фармацевтически активного ингредиента, как известно специалисту в данной области.

Пероральные композиции, в некоторых вариантах реализации, включают жидкие растворы, эмульсии, суспензии и т. п. В некоторых вариантах реализации, фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения таких композиций, хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах реализации, жидкие пероральные композиции содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,933% желательного соединения или соединений или, в другом варианте реализации от приблизительно 0,01% до приблизительно 10%.

В некоторых вариантах реализации, композиции для применения в способах согласно настоящему изобретению включают растворы или эмульсии, которые, в некоторых вариантах реализации, представляют собой водные растворы или эмульсии, содержащие безопасное и эффективное количество соединений согласно настоящему изобретению и возможно, другие соединения, предназначенные для топического интраназального введения. В некоторых вариантах реализации, композиции содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 10,0% в отношении массы к объему заявленного соединения, более предпочтительно от приблизительно 0,1% до приблизительно 2,0%, которые применяют для системной доставки соединений интраназальным путем.

В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют в мышцу (внутримышечная инъекция). В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют под кожу (подкожная инъекция). В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют в мышцу. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют в кожу. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, вводят путем системного введения. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, вводят путем внутривенной инъекции. В другом варианте реализации введение можно осуществлять парентерально, пульмонально, перорально, топически, внутрикожно, внутримышечно, интраперитонеально, внутривенно, подкожно, интраназально, трансназально, внутриглазным путем, офтальмически, эпидурально, буккально, ректально, трансмукозально, путем доставки в кишечник или парентерально, включая интрамедуллярные инъекции, а также путем интратекального или непосредственного интравентрикулярного введения.

В другом варианте реализации композицию вводят скорее местным, чем системным путем, например, путем инъекции композиции непосредственно в определенную область организма пациента.

В одном варианте реализации путь введения может быть энтеральным. В другом варианте реализации путь может быть конъюнктивальным, трансдермальным, внутрикожным, интраартериальным, вагинальным, ректальным, внутрипухольевым, параканцеральным, трансмукозальным, внутримышечным, внутрисосудистым, интравентрикулярным, интракраниальным, интраназальным, сублингвальным или комбинацией перечисленных путей.

В другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят путем внутривенной, интраартериальной или внутримышечной инъекции жидкой композиции. В некоторых вариантах реализации, жидкие лекарственные формы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и тому подобные формы. В одном варианте реализации фармацевтические композиции вводят внутривенно, и следовательно, они составлены в форме, подходящей для внутривенного введения. В другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят интраартериально, и следовательно, они составлены в форме, подходящей для интраартериального введения. В другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят внутримышечно, и следовательно, они составлены в форме, подходящей для внутримышечного введения.

Кроме того, в другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят топически на поверхности тела и, следовательно, они составлены в форме, подходящей для топического введения. Подходящие топические лекарственные формы включают гели, мази, кремы, лосьоны, капли и тому подобные формы. Для топического введения, соединения согласно настоящему изобретению комбинируют с дополнительным подходящим терапевтическим агентом или агентами, и их получают и применяют в виде растворов, суспензий или эмульсий в физиологически приемлемом разбавителе с добавлением или без фармацевтического носителя.

В одном варианте реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению получают с помощью процессов, хорошо известных в данной области, например, с помощью процессов обычного смешивания, растворения, гранулирования, получения драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации.

В одном варианте реализации фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением составлены обычным способом с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, включающих вспомогательные вещества и добавки, которые способствуют получению из активных ингредиентов композиций, которые можно применять в фармацевтике. В одном варианте реализации лекарственная форма зависит от выбранного пути введения.

В одном варианте реализации инъекционные лекарственные средства согласно настоящему изобретению составлены в виде водных растворов. В одном варианте реализации инъекционные лекарственные средства согласно настоящему изобретению составлены с применением физиологически совместимых буферов, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. В некоторых вариантах реализации, для трансмукозального введения в лекарственной форме применяют проникающие вещества, подходящие для барьера, через который нужно проникнуть. Такие проникающие вещества общеизвестны в данной области.

В одном варианте реализации композиции, описанные в настоящем тексте, входят в состав лекарственной формы для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В некоторых вариантах реализации, лекарственные формы для инъекции представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах возможно с добавлением консерванта. В некоторых вариантах реализации, композиции представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в маслянистых или водных средах и включают такие вспомогательные агенты, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Композиции также включают, в некоторых вариантах реализации, консерванты, такие как хлорид бензалкония и тимеросал и тому подобные консерванты; хелатирующие агенты, такие как эдетат натрия и другие хелатирующие агенты; буферы, такие как фосфат, цитрат и ацетат; регулирующие тоничность агенты, такие как хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннит и другие регулирующие тоничность агенты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистин, метабисульфат натрия и другие антиоксиданты; ароматические агенты; регулирующие вязкость агенты, такие как полимеры, включая целлюлозу и ее производные; и поливиниловый спирт и кислоту и основания для регулирования pH данных водных композиций при необходимости. Композиции также включают, в некоторых вариантах реализации, местные обезболивающие средства или другие активные вещества. Композиции можно применять в виде спреев, аэрозолей, капель и тому подобных форм.

В некоторых вариантах реализации, фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активного лекарственного средства в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных ингредиентов, в некоторых вариантах реализации, получают в виде суспензий для инъекций на подходящей масляной или водной основе. Подходящие липофильные растворители или среды включают, в некоторых вариантах реализации, жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды или липосомы. Водные суспензии для инъекций включают, в некоторых вариантах реализации, вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. В другом варианте реализации суспензия также содержит подходящие стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость активных ингредиентов, чтобы обеспечить возможность получения высококонцентрированных растворов.

В другом варианте реализации активное соединение можно доставлять в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat и др., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein и Fidler (ред.), Liss, Нью-Йорк, стр. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, стр. 317-327; J.E. Diederichs и др., *Pharm./nd.* 56 (1994) 267-275).

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, доставляемая в системе с контролируемым высвобождением, составлена для внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте реализации применяют насос (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald и др., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek и др., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). В другом варианте реализации можно применять полимерные материалы. В еще одном варианте реализации систему с контролируемым высвобождением можно поместить в непосредственной близости от терапевтической мишени, т.е. головного мозга, таким образом, потребуется лишь часть от дозы для системного введения (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, том 2, стр. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

В некоторых вариантах реализации, активный ингредиент находится в виде порошка для разбавления подходящей средой перед применением, например, стерильным апиrogenным водным раствором. Композиции, в некоторых вариантах реализации, составлены для введения пульверизацией и ингаляцией. В другом варианте реализации композиции содержатся в контейнере с присоединенным к нему пуль-

веризатором.

В одном варианте реализации лекарственное средство согласно настоящему изобретению включают в состав композиций для ректального введения, таких как суппозитории или удерживающие микроклизмы, применяя, например, обычные основы для суппозиторий, такие как масло какао или другие глицериды.

В некоторых вариантах реализации, фармацевтические композиции, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения предполагаемой цели. В некоторых вариантах реализации, терапевтически эффективное количество означает количество активных ингредиентов, эффективное для предотвращения, облегчения или снижения выраженности симптомов заболевания, или для увеличения выживаемости субъекта, которого лечат.

В одном варианте реализации определение терапевтически эффективного количества находится в рамках компетенции специалистов в данной области.

Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей или их компонентов, представляют собой сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и метилцеллюлоза; порошоканный трагакант; солод; желатин; тальк; твердые лубриканты, такие как стеариновая кислота и стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; полиолы, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновую кислоту; эмульгаторы, такие как эмульгаторы торговой марки Tween™; смачивающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия; красители; ароматизирующие агенты; таблетирющие агенты, стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; и фосфатные буферные растворы. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, который будут применять совместно с соединением, в основном определяется предполагаемым путем введения соединения. Если заявленное соединение предназначено для инъекции, в одном варианте реализации фармацевтически приемлемый носитель представляет собой стерильный физиологический солевой раствор с совместимым с кровью суспендирующим агентом, pH которого подвели приблизительно до 7,4.

Кроме того, композиции дополнительно включают связующие вещества (например, гуммиарабик, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), дезинтегрирующие агенты (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, крахмалгликолят натрия), буферы (например, Трис-HCl, ацетат, фосфат) с различными pH и ионной силой, вспомогательные вещества, такие как альбумин или желатин, для предотвращения поглощения поверхностями, детергенты (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, соли желчных кислот), ингибитор протеазы, поверхностно-активные вещества (например, лаурилсульфат натрия), усилители проникновения, солюбилизующие агенты (например, глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), повышающие вязкость агенты (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, аспартам, лимонную кислоту), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), лубриканты (например, стеариновую кислоту, стеарат магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), агент для повышения текучести (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия), полимерные покрытия (например, полксамеры или полксамины), покрытие и пленкообразующие агенты (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адьюванты.

Обычные компоненты носителей для сиропов, эликсиров, эмульсий и суспензий включают этанол, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, жидкую сахарозу, сорбит и воду. Для суспензии, обычные суспендирующие агенты включают метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, целлюлозу (например, Avicel™, RC-591), трагакант и альгинат натрия; обычные смачивающие агенты включают лецитин и полиэтиленоксидсорбитан (например, полисорбат 80). Обычные консерванты включают метилпарабен и бензоат натрия. В другом варианте реализации пероральные жидкие композиции также включают один или более таких компонентов, как подсластители, ароматизирующие агенты и красители, описанные выше.

Композиции также включают включение или нанесение активного материала на препараты полимерных соединений в форме частиц, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, гидрогели и т.д., или на липосомы, микроэмульсии, мицеллы, моноламеллярные или мультламеллярные везикулы, тени эритроцитов или сферопласты. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*.

В объем настоящего изобретения также входят композиции в форме частиц, покрытые полимерами

(например, полоксамерами или полоксаминами), и соединение, соединенное с антителами, направленными против тканеспецифичных рецепторов, лигандов или антигенов, или соединенное с лигандами тканеспецифичных рецепторов.

В некоторых вариантах реализации, соединения модифицированы ковалентным присоединением водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон или полипролин. В другом варианте реализации модифицированные соединения обладают по существу большим периодом полужизни из крови после внутривенной инъекции, чем таковой у соответствующих немодифицированных соединений. В одном варианте реализации модификации также повышают растворимость соединения в водном растворе, предотвращают агрегацию, повышают физическую и химическую стабильность соединения и сильно уменьшают иммуногенность и реакционную способность соединения. В другом варианте реализации желательной биологической активности *in vivo* добиваются введением таких абдуктов полимер-соединение с меньшей частотой или в меньших дозах, чем для немодифицированного соединения.

В некоторых вариантах реализации, получение эффективного количества или дозы можно сначала оценить в анализах *in vitro*. В одном варианте реализации дозу можно определить в моделях на животных, и полученную информацию можно использовать для более точного определения полезных доз у людей.

В одном варианте реализации токсичность и терапевтическую эффективность активных ингредиентов, описанных в настоящем тексте, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур *in vitro*, культур клеток или экспериментальных животных. В одном варианте реализации результаты, полученные с помощью таких анализов *in vitro* и культур клеток и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона дозировок для применения у человека. В одном варианте реализации дозировки изменяют в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. В одном варианте реализации конкретную лекарственную форму, путь введения и дозировку может выбрать лечащий врач с учетом состояния пациента (см., например, Fingl, и др., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", глава 1, стр. 1).

В одном варианте реализации в зависимости от тяжести и восприимчивости к лечению состояния, от которого лечат, введение доз можно осуществлять однократным или многократным введением, при этом курс лечения длится от нескольких дней до нескольких недель или до тех пор, пока не достигнут излечения или пока не добьются ослабления симптомов болезненного состояния.

В одном варианте реализации количество композиции, которое будут вводить, конечно, будет зависеть от субъекта, которого лечат, тяжести заболевания, способа введения, мнения лечащего врача и т.д.

В одном варианте реализации также получают композиции, содержащие лекарственное средство согласно настоящему изобретению, входящее в состав лекарственной формы вместе с совместимым фармацевтическим носителем, помещают в подходящий контейнер и маркируют, что она подходит для лечения указанного состояния.

В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, представляет собой лиофилизированное (т.е. высушенное сублимацией) лекарственное средство в комбинации с совокупностью органических вспомогательных веществ и стабилизаторов, таких как неионогенные поверхностно-активные агенты (т.е. поверхностно-активные вещества), различные сахара, органические полиолы и/или сывороточный альбумин человека. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит описанный лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильной воде для инъекции. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит описанный лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильном ФБР для инъекции. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит описанный лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильном 0,9% NaCl для инъекции.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и совокупность носителей, таких как сывороточный альбумин человека, полиолы, сахара и анионные поверхностно-активные стабилизирующие агенты. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и лактобионовую кислоту и ацетатный/глициновый буфер. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и аминокислоты, такие как аргинин или глутамат, которые повышают растворимость композиций интерферона в воде. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и глицин или сывороточный альбумин человека (ЧСАч), буфер (например, ацетатный) и изотонический агент (например, NaCl). В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и фосфатный буфер, глицин и ЧСА.

В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, стабилизируют путем помещения в буферные растворы, обладающие рН между приблизительно 4 и 7,2. В другом варианте реализации фармацевтическую компози-

цию, содержащую фактор свертывания крови, помещают в буферный раствор, обладающий рН между приблизительно 4 и 8,5. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, помещают в буферный раствор, обладающий рН между приблизительно 6 и 7. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, помещают в буферный раствор, обладающий рН, равным приблизительно 6,5. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, стабилизируют с помощью аминокислоты в качестве стабилизирующего агента и, в некоторых случаях, с помощью соли (если аминокислота не содержит заряженную боковую цепь).

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, представляет собой жидкую композицию, содержащую стабилизирующий агент в количестве между приблизительно 0,3 и 5 мас.%, который представляет собой аминокислоту.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обеспечивает точность введения и безопасность продукта. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обеспечивает биологически активную, стабильную жидкую лекарственную форму для применения в виде инъекции. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит нелиофилизированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обеспечивает жидкую лекарственную форму, позволяющую хранение в течение длительного периода времени в жидком состоянии, что упрощает хранение и транспортировку перед введением.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, содержит твердые липиды в качестве материала матрицы. В другом варианте реализации инъекционная фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, содержит твердые липиды в качестве материала матрицы. В другом варианте реализации получение липидных микрочастиц путем расплывательной кристаллизации описано у Speiser (Speiser и др., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54), из которых затем получают липидные наногранулы для перорального введения (Speiser EP 0167825 (1990)). В другом варианте реализации липиды, которые используют, хорошо переносятся организмом (например, глицериды, состоящие из жирных кислот, которые присутствуют в эмульсии для парентерального введения).

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает полимерные микрочастицы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает наночастицы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает липосомы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает липидную эмульсию. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает микросферы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает липидные наночастицы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает липидные наночастицы, включающие амфифильные липиды. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает липидные наночастицы, содержащее лекарственное средство, липидную матрицу и поверхностно-активное вещество. В другом варианте реализации липидная матрица содержит по меньшей мере 50% в весовом отношении моноглицерида.

В одном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению представлены в упаковке или в дозирующем устройстве, таком как одобренный Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (FDA) набор, который включает одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном варианте реализации упаковка, например, включает металлическую или полимерную пленку, например, блистерную упаковку. В одном варианте реализации упаковка или дозирующее устройство сопровождается инструкциями для введения. В одном варианте реализации упаковка или дозирующее устройство сопровождается уведомлением, сопровождающим контейнер, в виде, предусмотренном государственным органом, регулирующим производство, применение или реализацию лекарственных средств, и на этом уведомлении отражено одобрение данным органом формы данных композиций или введения человеку или животному. Такое уведомление, в одном варианте реализации представляет собой этикетку, одобренную Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США для лекарственных средств рецептурного отпуска, или одобренный листок-вкладыш.

В одном варианте реализации должно быть очевидно, что факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать индивиду совместно с дополнительными активными агентами,

чтобы добиться улучшенного терапевтического действия, по сравнению с лечением каждым агентом отдельно. В другом варианте реализации принимают меры (например, выбор дозировки и дополнительного агента), чтобы избежать неблагоприятных побочных действий, которые связаны с комбинированными методами лечения.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения биологического периода полужизни полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего продлевается биологический период полужизни указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего увеличивается AUC указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FVIIa.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид СТР-модифицированного фактора IX (FIX), состоящий из полипептида FIX и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного СТР-модифицированного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, при этом последовательность указанного СТР-модифицированного полипептида FIX представляет собой последовательность, описанную в SEQ ID NO: 31. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором по



ализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбокси-концевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбокси-концевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором последовательность указанного СТР-модифицированного полипептида FIX представляет собой последовательность, описанную в SEQ ID NO: 31. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающего полипептид FIX и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором последовательность указанного СТР-модифицированного полипептида FIX представляет собой последовательность, описанную в SEQ ID NO: 31. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

В данной области широко известно, что модифицированные пептиды и белки согласно настоящему изобретению можно соединить с метками, лекарственными средствами, нацеливающими агентами, носителями, твердыми подложками и т. п., в зависимости от желательного применения. Меченые формы модифицированных биопрепаратов можно применять для отслеживания их метаболического пути; подходящие для данной цели метки включают, в особенности, радиоизотопные метки, такие как йод 131, техний 99, индий 111 и тому подобные метки. Метки также можно применять в качестве средства детектирования модифицированных белков или пептидов в системах анализа; в данном примере, также можно применять радиоактивные изотопы, а также ферментные метки, флуоресцентные метки, хромогенные метки и тому подобные метки. Применение таких меток особенно полезно, если пептид или белок сам по себе является нацеливающим агентом, таким как антитело или лиганд рецептора.

Аналогичные методики связывания, наряду с другими, можно применять для соединения модифицированных пептидов и белков согласно настоящему изобретению с твердыми подложками. После присоединения, данные модифицированные пептиды и белки затем можно применять в качестве аффинных реагентов для отделения желательных компонентов, с которыми происходит специфичное связывание.

Наконец, модифицированные пептиды и белки согласно настоящему изобретению можно применять для получения антител, в частности, иммунореактивных с данными новыми соединениями. Данные антитела полезны для множества диагностических и терапевтических применений, в зависимости от природы биологической активности немодифицированного пептида или белка. Должно быть очевидно, что согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые иммунореактивны с СТР-модифицированным FIX, FVII или FVIIa, описанными в настоящем тексте. В одном варианте реализации такие антитела можно применять для того, чтобы отличить или идентифицировать СТР-модифицированные факторы свертывания крови, которые ввели, от эндогенных факторов свертывания крови. В другом варианте реализации антитела можно применять, чтобы определить местонахождение введенных СТР-модифицированных факторов свертывания крови.

Дополнительные предметы, преимущества и новые свойства настоящего изобретения станут очевидны для среднего специалиста в данной области после изучения следующих примеров, которые не предполагаются как ограничивающие. Кроме того, каждый из различных вариантов реализации и аспектов настоящего изобретения, описанных выше в настоящем тексте и заявленных в формуле изобретения ниже, находит экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

### Примеры

В целом терминология, используемая в настоящем тексте, и лабораторные процедуры, используемые в настоящем изобретении, включают молекулярные, биохимические, микробиологические методики и технологии рекомбинантной ДНК. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook и др., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", тома I-III, Ausubel, R.M., ред. (1994); Ausubel и др., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Балтимор, Мэриленд (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Нью-Йорк (1988); Watson и др., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Нью-Йорк; Birten и др. (ред.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", тома 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк (1998); методики, описанные в патентах США с номерами 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", тома I-III, Cellis, J.E., ред. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), третье издание; "Current Protocols in Immunology", тома I-III, Coligan J.E., ред. (1994); Stites и др. (ред.), "Basic and Clinical Immunology" (8oe издание), Appleton & Lange, Норуолк, Коннектикут (1994); Mishell и Shiigi (ред.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman и Co., Нью-Йорк (1980); доступные иммуноанализы подробно описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США с номерами 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ред. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., и Higgins S.J., ред. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., и Higgins S.J., ред. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I, ред. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) и "Methods in Enzymology", том 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, Сан-Диего, Калифорния (1990); Marshak и др., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); каждая из которых включена посредством ссылки. Другие основные ссылки приведены повсюду в настоящем описании.

Пример 1. Получение и применение фактора свертывания крови IX.

Клонирование и экспрессия рекомбинантной молекулы FIX.

Клоны фактора IX конструировали в эукариотическом векторе экспрессии pCI-neo (Promega, номер в каталоге E1841). Клон с открытой рамкой считывания (ОРС) фактора свертывания крови IX Homo sapiens заказали в "OriGene" (RC219065). Праймеры заказали в Sigma-Genosys.

Конструирование 301-1-pCI-neo-p200-11 (фактор IX-ср x2).

Праймер 101: 5' GTT TAGTGAACCGTCAGAAT 3' (SEQ ID NO: 36).

Праймер 103<sup>R</sup>: 5' TTGAGGAAGATGTTCTGTGTA 3' (содержит сайт SspI фактора IX) (SEQ ID NO: 37).

Полимеразную цепную реакцию (реакцию ПЦР) осуществляли с праймером 101 и обратным праймером 103<sup>R</sup> и с плазмидной ДНК, клоном кДНК фактора IX ("OriGene" RC219065) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт размером ~ 1085 п.о. (пцр 10), который очищали из геля (фрагмент, содержащий N-конец последовательности фактора IX).

Праймер 98: 5' ATTACAGTTGTGCGCAGGTGA 3' (SEQ ID NO: 38).

Праймер 99<sup>R</sup>: 5' GCTGGAGCTAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTT 3' (SEQ ID NO: 39).

Праймер 100: 5' GCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3' (SEQ ID NO: 40).

Праймер 27<sup>R</sup>: 5' TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG 3' (SEQ ID NO: 41).

Осуществляли три реакции ПЦР. Первую реакцию осуществляли с праймером 98 и праймером 99<sup>R</sup> и плазмидной ДНК, клоном кДНК фактора IX ("OriGene", RC219065) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 540 п.о.

Вторую реакцию осуществляли с праймером 100 и праймером 27<sup>R</sup> и плазмидной ДНК 402-2-p72-3 (hGH-СТР-СТР) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 258 п.о.

Последнюю реакцию (пцр 3) осуществляли с праймерами 98 и 27<sup>R</sup> и смесью продуктов предыдущих двух реакций в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 790 п.о., который лигировали в клонирующий вектор TA (Invitrogen, номер в каталоге K2000-01). Выделяли фрагмент, полученный путем обработки рестриктазами SspI -EcoRI (TA 3-3).

Другую реакцию ПЦР (пцр 12) осуществляли с праймером 101 и праймером 27<sup>R</sup>, и со смесью продуктов пцр 10 и фрагментом SspI-EcoRI из пцр 3 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 1700 п.о. (фактор IX-стр-стр), который лигировали в клонирующий вектор TA (Invitrogen, номер в каталоге K2000-01) (лиг 180).

В последовательности фактора IX обнаружили ошибку, поэтому фрагменты заменили, чтобы получить вставку фактора IX-стр-стр с правильной последовательностью ДНК.

ТА-пцр 3-3 расщепляли рестриктазами SspI и XbaI и выделяли большой фрагмент (вектор). ТА 180-4 расщепляли рестриктазами SspI и XbaI и выделяли малый фрагмент (вставку), который лигировали с выделенным большим фрагментом ТА-пцр-3-3, расщепленным SspI и XbaI. Новую плазмиду ТА-183-2 расщепляли рестриктазами SalI и NotI, и выделяли вставку фактора IX-стр-стр (~1575 п.о.). Данный фрагмент встраивали в эукариотический вектор экспрессии pCI-neo (расщепленный SalI и Not I) с получением клона 301-2-p200-11.

Конструирование pCI-dhfr -фактор 9- стр x2 (p223-4). Вектор pCI-dhfr (p6-1) расщепляли рестриктазами SmaI и NotI. Фактор IX-СТР-СТР (p200-11) расщепляли рестриктазами ASisI F.I. и NotI. Полученные два фрагмента лигировали.

Конструирование pCI-dhfr-фактор 9-стр x3 (p225-7). Вектор pCI-dhfr OXM-СТРx3 (p216-4) расщепляли рестриктазами XbaI и ApaI. Фактор IX-СТР-СТР (223-4) расщепляли рестриктазами XbaI и ApaI. Полученные два фрагмента лигировали.

Конструирование pCI-dhfr-фактор 9-стр x3 T148A (p243-2). В плазмиде p225-7, содержащей треонин в положении 148, Thr заменили на Ala, методом сайт-направленного мутагенеза, поскольку наиболее часто встречающийся вариант FIX содержит аланин в данном положении.

Праймер 75: ctccagttcaattacagct (SEQ ID NO: 42).

Праймер 122r: ggaaaaactgcctcagcacgggtgagc (SEQ ID NO: 43).

Праймер 123: gtgctgaggcagttttcctgatgtggactat (SEQ ID NO: 44).

Праймер 124r: caacacagtgggcagcag (SEQ ID NO: 45).

Осуществляли три реакции ПЦР. Первую реакцию осуществляли с праймером 75 и праймером 122r и плазмидной ДНК p225-7 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 692 п.о., который очищали из геля. Вторую реакцию ПЦР осуществляли с праймером 123 и праймером 124r и плазмидной ДНК p225-7 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~237 п.о., который очищали из геля. Третью перекрывающуюся реакцию ПЦР осуществляли с праймерами 75 и 124r и смесью продуктов предыдущих двух реакций в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~910 п.о. Полученный продукт перекрывающейся ПЦР расщепляли рестриктазами XbaI и NsiI и заново лигировали в плазмиду p225-7 (расщепленную XbaI и NsiI) с получением плазмиды фактор IX-стр x3 T148A, обозначенной p243-2.

Конструирование FIX-4СТР (p259-4). Фрагмент 3,5СТР выделяли из охум-4СТР (p254-3) с помощью рестрикционных ферментов ApaI и XbaI. Фрагмент FIX+0,5СТР выделяли из FIX-3СТР (p243-2) с помощью рестрикционных ферментов ApaI и XbaI. Полученные два фрагмента лигировали.

Конструирование FIX-5СТР (p260-18). Фрагмент 4,5СТР выделяли из охум-5СТР (255-1) с помощью рестрикционных ферментов ApaI и XbaI. Фрагмент FIX+0,5СТР выделяли из FIX-3СТР (p243-2), применяя ферменты ApaI и XbaI. Полученные два фрагмента лигировали.

Клетки Dg44 высевали на 100 мм чашки для культивирования клеток и растили до конfluenceности 50-60%. Всего 2 мкг (микрограмма) кДНК FIX использовали для трансфекции одной 100 мм чашки, применяя реагент FuGene (Roche) в безбелковой среде (Invitrogene CD Dg44). Среды удаляли через 48 ч после трансфекции и заменяли на безбелковую среду (Invitrogene CD Dg44) без нуклеозидов в присутствии 800 мкг/мл G418 (неомицина). Через 14 дней популяцию трансфицированных клеток переносили во флаконы для культивирования клеток T25 и продолжали селекцию в течение дополнительных 10-14 дней, до тех пор, пока клетки не стали расти как стабильные клоны. Выбирали клоны с высоким уровнем экспрессии. Приблизительно  $2 \times 10^7$  клеток использовали для инокуляции 300 мл ростовой среды в роллерной бутылки 1700 см<sup>2</sup> (Corning, Корнинг, Нью-Йорк), дополненной 5 нг/мл витамина K3 (менадиона натрия бисульфат; Sigma). Кондиционированную среду собирали (собранный продукт) после быстрого снижения жизнеспособности клеток до приблизительно 70%. Кондиционированную среду сначала осветляли, а затем концентрировали приблизительно в 20 раз и диализовали против ФБР, применяя проточную фильтрационную кассету (с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа; Millipore Corp.).

Определение уровня антигена FIX. Уровни антигена в полученном FIX-СТР определяли с помощью набора для ELISA FIX человека AssayMax ELISA FIX (AssayPro-EF1009-1). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по трем различным разведениям в двух независимых экспериментах (фиг. 1А, табл. 1).

Таблица 1. Рассчитанная концентрация белка

	FIX-СТР	FIX-СТР-СТР
Уровень АГ FIX (мкг/мл)	41,9	19,2
Стандартное отклонение (СО)	8,76	3,67
Коэффициент вариации (% КВ)	20,92	19,15

ЭФ в ПААГ/ДСН - иммуноблоттинг FIX. Собранный FIX-СТР или очищенный rhFIX (American Diagnostics), по 100 нг белка, загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя поликлональное антитело к FIX человека и моноклональное антитело, распознающее гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics). Ранее сообщали, что rhFIX мигрировал в геле на уровне 55 кДа, тогда как FIX, слитый с двумя СТР, мигрировал на уровне 75 кДа. Показано, что оба варианта белков FIX-СТР были гамма-карбоксилированными, такая посттрансляционная модификация необходима для активности и функционирования FIX (фиг. 1В).

Определение хромогенной активности FIX. Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* собранного FIX-СТР по сравнению с белком rhFIX (American Diagnostics), применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). В присутствии тромбина, фосфолипидов, кальция, избыточные количества FXIa активируют собранный FIX в FIXa. FIXa образует ферментативный комплекс с тромбином, активированным FVIII:C (подаваемым в избыточных количествах), фосфолипидами и кальцием и активирует фактор X, присутствующий в аналитической системе, в FXa. Активность непосредственно коррелирует с количеством FIX, которое является лимитирующим фактором. Затем измеряли удельную активность полученного FXa в отношении хромогенного субстрата FXa (pNA). Полученное количество pNA прямо пропорционально активности FIXa. Готовили серийные разведения rhFIX и собранного FIX-СТР, и оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости собранного FIX с эталонным препаратом, состоящим из rhFIX или плазмы человека. Среднее значение EC50 для FIX составляло 21 нг/мл, тогда как рассчитанное значение EC50 для собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub> составляло 382 нг/мл, и рассчитанное значение EC50 для собранного FIX-СТР составляло 1644 нг/мл. Наблюдали приблизительно 15-кратное снижение ферментативной активности собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub> (фиг. 2).

Свертывающая активность FIX (АЧТВ). Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является мерой целостности внутреннего и общего путей каскада свертывания крови. АЧТВ представляет собой время в секундах свертывания плазмы после добавления активатора внутреннего пути, фосфолипида и кальция. Реагент АЧТВ называют частичным тромбопластином, так как тканевый фактор не включен в фосфолипид, в отличие от реагента протромбинового времени (ПВ). Активатор запускает систему, а затем в присутствии фосфолипида осуществляются остальные этапы внутреннего пути. Эталонный диапазон АЧТВ различается в разных лабораториях, но обычно составляет 27-34 с.

Главной целью анализа являлось количественное определение способности собранного FIX-СТР восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FIX, путем добавления rhFIX. 300 мкл плазмы человека, обедненной FIX, смешивали со 100 мкл rhFIX или собранного FIX-СТР и готовили серийные разведения. После инкубации в течение 60 с при 37°C в смесь добавляли тромбопластин, CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды, и определяли время свертывания крови в секундах (выполняли в American Medical Laboratories). Оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости собранного FIX с эталонным препаратом, состоящим из rhFIX или плазмы человека. Одна единица активности FIX соответствует концентрации FIX, при которой активность равна активности одного мл нормальной плазмы человека. Представленные результаты АЧТВ указывают на то, что FIX-(СТР)<sub>2</sub> продемонстрировал 5,7-кратное снижение удельной коагулирующей активности по сравнению с rhFIX (табл. 2). Более того, результаты АЧТВ вместе с результатами анализа хромогенной активности *in vitro* позволяют предположить, что собранный FIX-(СТР)<sub>2</sub> обладает улучшенной ферментативной активностью по сравнению с собранным FIX-СТР (табл. 2). Улучшенную активность белков FIX-СТР можно получить после оптимизации системы экспрессии (т.е. котрансфекции фурином и оптимизации концентрации в среде витамина K3), которую усиливали после супертрансфекции фурином (результаты не представлены).

Таблица 2. Свертывающая активность FIX

rhFIX(AD) ) (мкг/мл)	ЧТВ (сек.)	FIX-СТР (мкг/мл)	ЧТВ (сек.)	FIX-СТР-СТР (мкг/мл)	ЧТВ (сек.)
5	31,3	9	45,2	4	47,5
1,25	35,7	2,25	53,3	1	55,9
0,3125	43	0,5625	64,1	0,25	67
0,078125	52,1	0,140625	76,3	0,0625	77,4

Фармакокинетическое исследование. RhFIX (American Diagnostic) и собранный FIX-СТР вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество) в дозе 75 мкг/кг массы тела (табл. 3).

Таблица 3. План проведения ФК исследования

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество животных/ группу	Путь введения	Пол	Уровень дозы (мкг/кг)	Уровень дозы (мкг на животное)	Инъецированный объем (мкл)	Конц. (мкг/мл)	*Моменты времени (часы после введения)
1	rhFIX	6	в/в	м	75	15	500	30	0 (до введения), 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
2	rhFIX-СТР	6	в/в	м	75	15	500	30	0 (до введения), 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
3	rhFIX-СТР-СТР	6	в/в	м	75	15	1000	15	0 (до введения), 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.

Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48 и 72 ч после введения. Плазму получали сразу после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Концентрацию FIX определяли с использованием специального анализа ELISA для FIX (AssayPro). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой среднее значение по 3 животным в каждый момент времени (фиг. 3). Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В табл. 4 кратко описаны наблюдаемые концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов.

Таблица 4. Наблюдаемые концентрации FIX

Время (ч.)	FIX-AD (нг/мл)	FIX-СТР (нг/мл)	FIX-СТР-СТР (нг/мл)
0,083	1506,7	1477,5	1914,8
0,5	1949,8	1150,1	1830,1
1,5	2189,4	1009,0	1264,3
4	733,90	709,33	1000,00
8	319,80	167,20	1234,67
24	НПКО	54,625	230
48	НПКО	НПКО	120,9

ФК профиль и краткое описание конечных периодов полужизни представлены в табл. 5. У собранного FIX-СТР выявили улучшенные значения  $T_{1/2\beta}$  по сравнению с rhFIX (повышение в 2 и 5 раз, соответственно). Поскольку в серии доз FIX концентрации FIX в сыворотках животных через 24 ч были ниже предела количественного определения (НПКО), дополнительные ФК параметры не рассчитывали.

Таблица 5. Краткое описание ФК параметров

Продукт	Конечный период полужизни (ч.)	Отношение (FIX-СТР)/rhFIX
rhFIX (American Diagnostics)	2,62	–
FIX-СТР	5,55	2,11
FIX-СТР (FIX-СТР-СТР)	12,9	4,92

В данном исследовании был описан новый подход к продлению периода полужизни FIX при сохра-

нении его терапевтической эффективности. Присоединение пептида СТР к активному белку потенциально опасно, так как может снижать активность белка. Следовательно, получение активного рекомбинантного FIX-СТР путем добавления последовательности СТР на С-конце FIX является неожиданным.

Исследование FIX-СТР-СТР, очищенного иммуноаффинным способом.

Очистка FIX-СТР-СТР.

Чтобы оценить белок при высокой степени очистки с повышенной активностью, ФК профиль которого имитирует и может быть экстраполирован на клинические условия, FIX модифицировали 2 молекулами СТР, последовательно присоединенными к карбоксильному концу, с получением FIX-СТР-СТР. FIX-СТР-СТР очищали, применяя связанное с матрицей моноклональное антитело против гамма-карбоксиглутамиловых (Gla) остатков, присутствующих в аминоконцевом участке FIX (American Diagnostics, номер в каталоге 3570MX). Моноклональное антитело было связано с сефарозой CL-4В. Собранный FIX-СТР-СТР при концентрации 88 мкг/мл диализовали против 20 мМ трис, 150 мМ NaCl и 10 мМ ЭДТА при pH 7,4. Скорость загрузки на колонку составляла 0,5 мл/мин, элюирование осуществляли, применяя 20 мМ трис-HCl, 350 мМ NaCl и 50 мМ CaCl, и свободную фракцию вновь подвергали очистке еще пять раз. Наконец, элюированную фракцию диализовали против ФБР, собирали и концентрировали.

Определение уровня антигена FIX. Определяли уровни собранного FIX-СТР, собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub> и очищенного белка FIX-(СТР)<sub>2</sub>, применяя набор для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка (мкг/мл) представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам (фиг. 4, табл. 6).

Таблица 6. Рассчитанная концентрация белка

	FIX-СТР	FIX-СТР-СТР	FIX-СТР-СТР (очищенный)
Уровень АГ FIX (мкг/мл)	125,78	88,53	172,9
СО	17,28	21,31	2,63
% КВ	13,74	24,08	1,52

Кроме того, осуществляли количественный анализ FIX-СТР-СТР с помощью метода Бредфорд. Рассчитанная концентрация составляла 202 мкг/мл, и она была сходна с концентрацией, выявленной с помощью ELISA FIX человека.

Блоты гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН. Собранный FIX-СТР-СТР, свободную фракцию и очищенный белок загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью окрашивания кумасси осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым голубым (800 нг белка). Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) осуществляли со 100 нг белка, поликлональным антителом (АТ) к FIX человека и моноклональным АТ, узнающим гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499 и #3570). Процедура иммуноаффинной очистки значительно обогатила содержание FIX-СТР-СТР, при этом уменьшив количество примесей (фиг. 5).

Аминоконцевое секвенирование. Очищенный белок FIX-СТР-СТР разделяли с помощью ЭФ в 12% трис-глициновом ПААГ/ДСН, а затем осуществляли электроблоттинг (электрофоретический перенос) на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Интересующую полосу вырезали и помещали на очищенный обработанный биобренном (BioBrene) стекловолоконный фильтр. Анализ аминоконцевой последовательности осуществляли путем расщепления по Эдману, применяя импульсный жидкофазный белковый секвенатор, оборудованный микроградиентной системой ВЭЖХ 140 С. Аминоконцевое секвенирование показало, что FIX-СТР-СТР представлял собой смесь белков с неполностью и полностью отщепленным пропептидом. Было показано, что неполное отщепление пропептида снижает коагулирующую активность FIX. Процесс отщепления пропептида можно улучшить путем котрансфекции фурином.

Определение хромогенной активности FIX. Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* очищенного белка FIX-СТР-СТР по сравнению с rhFIX (American Diagnostics) и объединенной нормальной плазмой человека, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). В присутствии тромбина, фосфолипидов и кальция, избыточные количества FXIa активируют FIX в FIXa. FIXa образует ферментативный комплекс с тромбином (подаваемым в избыточных количествах), фосфолипиды и кальций активируют фактор X, присутствующий в аналитической системе, в FXa. Активность непосредственно коррелирует с количеством FIX, которое представляет собой лимитирующий фактор. Количество полученного FXa измеряли по его удельной активности по отношению к хромогенному субстрату FXa (pNA). Количество образованного pNA прямо пропорционально активности FIXa. Готовили серийные разведения rhFIX, плазмы человека и FIX-СТР-СТР, и оценивали эффективность путем сравнения кривых дозовой зависимости (фиг. 6). Среднее значение EC<sub>50</sub> для rhFIX составляло 68,74 нг/мл, тогда как рассчитанное для FIX-СТР-СТР EC<sub>50</sub> составляло 505 нг/мл. Наблюдалось приблизительно 7-кратное снижение ферментативной активности FIX-СТР-СТР по сравнению с рекомбинантным FIX и 16,5-кратное снижение по сравнению с собранной нормальной плазмой человека. Такую пониженную активность можно объяснить неполным отщеплением аминоконцевого пропептида, которое обнаружили при аминоконцевом анализе.

Свертывающая активность FIX (АЧТВ). Активированное частичное тромбопластиновое время

(АЧТВ) является мерой целостности внутреннего и общего путей каскада свертывания крови. АЧТВ представляет собой время (измеренное в секундах), которое требуется плазме для свертывания после добавления активатора внутреннего пути, фосфолипида и кальция.

В данном анализе осуществляли количественное определение способности белка FIX-СТР-СТР восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FIX, путем добавления rhFIX. 300 мкл плазмы человека, обедненной FIX, смешивали с 100 мкл rhFIX, FIX-СТР-СТР (FIX-СТР-СТР (СТР были последовательно присоединены к С-концу)) или объединенной нормальной плазмы человека, и дополнительно разбавляли. После инкубации в течение 60 с при 37°C в смесь добавляли тканевый фактор (TF), CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды. Определяли время свертывания крови в секундах. Эффективность оценивали путем сравнения кривой дозовой зависимости FIX-СТР-СТР с таковой для эталонного препарата rhFIX или плазмы человека. За одну единицу FIX приняли количество FIX, при котором его активность равна активности 1 мл нормальной плазмы человека.

Представленные результаты АЧТВ указывают на то, что коагулирующая активность FIX-СТР-СТР лишь в 1,4 меньше, чем у объединенной нормальной плазмы человека, и аналогична rhFIX. Результаты АЧТВ вместе с результатами анализа хромогенной активности *in vitro* позволяют предположить, что очистка FIX-СТР-СТР не нарушала его активность.

Фармакокинетическая активность FIX-СТР-СТР. Очищенный FIX-СТР-СТР, rhFIX (American Diagnostic) и собранные FIX-СТР-СТР и FIX-СТР вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по восемь крыс на вещество) в дозе 100 мкг/кг массы тела (табл. 7).

Таблица 7. План проведения ФК исследования

Группы лечения	Исследуемый препарат	Кол-во животных/ группу/ момент времени	Уровень дозы (мкг/кг)	Уровень дозы (мкг на животное)	Инъекционный объем (мкл)	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (часы после введения)
A	rhFIX	8	100	20	500	40	0 (до введения) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
B	rhFIX-СТР (собранный)	8	100	20	500	40	0 (до введения) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
C	rhFIX-СТР-СТР (собранный)	6	100	20	500	40	0 (до введения) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
D	rhFIX-СТР-СТР (очищенный)	4	100	20	500	40	0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 4, 8, 72.

Образцы крови поочередно отбирали из ретроорбитального синуса 4 крыс через 0,083, 0,5, 2, 4, 7, 10, 24, 48 и 72 ч после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Концентрацию FIX определяли, применяя набор для ELISA FIX человека (Affinity Biologics). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль в виде среднего значения по 4 животным в каждый момент времени (фиг. 7). Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В табл. 8 кратко описаны наблюдаемые концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов.

Таблица 8. Наблюдаемые концентрации FIX

Время (ч.)	Собранный FIX-СТР, нг/мл	Собранный FIX-СТР <sub>2</sub> , нг/мл	rhFIX, нг/мл	Очищенный FIX-СТР-СТР, нг/мл
0,085	1038,97	1123,62	325,05	886,48
0,5	939,12	956,80	274,58	670,92
1	791,97	843,85	222,90	674,17
2	304,98	673,31	186,00	503,91
4	315,37	525,50	109,69	357,36
7	171,45	384,36	67,62	257,02
10	50,34	250,73	40,20	158,66
24	10,07	78,50	НПКО	52,13
48	НПКО	23,40	НПКО	18,07

Краткое описание ФК параметров представлено в табл. 9.

Таблица 9. Краткое описание ФК параметров

	T <sub>1/2</sub> (ч.)	AUC, нг/ч/мл	MRT (ч.)	Vd мл/кг	CL мл/ч/кг
<b>Собранный FIX-СТР</b>	4,17	3622	4,5	155,1	27,6
<b>Собранный FIX-СТР<sub>2</sub></b>	10,44	9105,7	12	165,4	10,9
<b>rhFIX</b>	3,72	1416,8	5,1	373,8	70,183
<b>Очищенный FIX-СТР-СТР</b>	11,14	6314,2	12,3	254,5	15,83

MRT - среднее время удерживания; Vd - объем распределения; CL - клиренс.

Для собранного FIX-СТР-СТР продемонстрировали улучшенный ФК профиль по сравнению с собранным FIX-СТР. Более того, для очищенного FIX-СТР-СТР выявили 3-кратное увеличение значения T<sub>1/2</sub>β и 4,5-кратное увеличение AUC по сравнению с rhFIX. Пониженное количество секретированного FIX, слитого с последовательно присоединенными молекулами СТР, по сравнению с FIX, слитым с одним СТР, видимо, является следствием присоединения дополнительного СТР, а не ухудшения детектирования методом ELISA, так как концентрация очищенного FIX-СТР-СТР, рассчитанная методом Бредфорд, была сходна с концентрацией, рассчитанной с помощью ELISA.

Свертывающая активность FIX-СТР-СТР была близка к активности для объединенной плазмы человека; тем не менее, его хромогенная активность *in vitro* была значительно ниже, чем у rhFIX или объединенной плазмы человека. Анализ хромогенной активности считают очень чувствительным анализом, по сравнению с анализом свертывания крови. Причина пониженной активности FIX-СТР-СТР может быть разной. Добавление СТР может снижать аффинность FIX к FXIa или уменьшать посттранскрипционные модификации (например, 12-10 остатков GLA и отщепление пропептида). Аминоконцевой анализ показал, что протеолитическое отщепление пропептида FIX-СТР-СТР не было полностью завершено перед секрецией. Поскольку данная посттранскрипционная модификация важна для нормальной ферментативной активности белка, котрансфекция плазмидой фурин-РАСЕ полезна и может улучшить активность FIX-СТР-СТР.

Наконец, сравнительное фармакокинетическое исследование FIX-СТР-СТР на крысах продемонстрировало, что слияние двух последовательно присоединенных СТР с C-концом FIX позволяло получить FIX с увеличенным периодом полужизни.

Модель на мышях с дефицитом FIX. Для того чтобы оценить активность *in vivo*, получали мышей с нокаутированным геном FIX и создавали размножающуюся линию. 10 мкг либо доступного для приобретения рекомбинантного hFIX (BeneFIX®), либо rFIX-(СТР)<sub>2</sub> (FIX-СТР-СТР) вводили путем инъекции в хвостовую вену мыши после анестезии (массой 22-28 г.) с нокаутированным геном FIX. Количество инъектированного белка было равно необходимой концентрации FIX в нормальной плазме (5 мкг/мл). Образцы крови отбирали из рассеченного хвоста в гепаринизированные капиллярные пробирки в определен-

ные моменты времени. Оценивали уровни FIX в образцах плазмы методом ELISA и измеряли эффективность с использованием анализа АЧТВ на свертывание крови.

Повышение эффективности отщепления пропептида FIX. КДНК пептида СТР соединяли с 3'-концом кДНК FIX человека. Соответствующими конструкциями, экспрессирующими rFIX и фурин, котрансфицировали клетки Dg44; кДНК rFIX человека также котрансфицировали с плазмидой, экспрессирующей фурин, в качестве контроля. Секрция высокого уровня FIX приводит к секрции смеси профактора и зрелого фактора FIX, вследствие ограниченного количества протеазы фурина в клетке. Котрансфекция вектором, экспрессирующим фурин, с вектором, экспрессирующим профактор, повышает выход и приводит к секрции в среду полностью процессированного FIX.

После котрансфекции FIX-(СТР)<sub>2</sub> и фурином получали стабильные клоны и собирали их для оценки отщепления пропептида. 100 нг белка загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Осуществляли анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью иммуоблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя поликлональные АТ к FIX человека (American Diagnostics) и поликлональное антитело к пропептиду. Ранее сообщали, что rhFIX мигрировал на уровне 55 кДа, тогда как FIX, слитый с двумя СТР, мигрировал на уровне 75 кДа. Показали, что оба варианта белков FIX подверглись правильному отщеплению пропептида.

Для того чтобы определить, улучшало ли ферментативную активность FIX-(СТР)<sub>2</sub> правильное отщепление пропептида, проводили сравнительную оценку хромогенной и коагулирующей активности собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub>, котрансфицированного фурином. Наблюдали существенные улучшения удельной активности FIX-(СТР)<sub>2</sub>, которая была сходна с таковой для rhFIX.

В заключение, результаты, описанные в настоящем тексте, позволяют предположить, что FIX-СТР-СТР можно эффективно применять для лечения пациентов с гемофилией В. FIX, слитый с конструкциями СТР, полезен благодаря улучшенным фармакологическим свойствам *in vivo*, которые компенсируют недостатки некоторых показателей *in vitro*. Данное предложенное лечение обладает преимуществом над известными способами лечения, так как оно позволяет уменьшить частоту инфузий и необходимое количество доз.

Стоит отметить, что когда для увеличения периода полужизни FIX применяли стратегию присоединения молекулы альбумина, рекомбинантный FIX становился неактивным. Предложенный новый подход обеспечил создание и очистку нового рекомбинантного FIX-слитого белка, который проявил улучшенную длительную активность. Поскольку сами по себе модификации не улучшали фармакокинетику вводимого путем инъекции FIX, обнаружение того, что СТР, слитый с FIX, улучшает фармакокинетические параметры, было неожиданным. Присутствие высокогликозилированного пептида-остатков сиаловой кислоты стабилизировало белок и защищало его от взаимодействий с сосудистыми рецепторами, не нарушая ключевые факторы, определяющие функционирование FIX.

FIX-СТР обладает терапевтической эффективностью, близкой к эффективности у rFIX, у пациентов с гемофилией В и требует менее частого введения. Однократной инъекции FIX-СТР достаточно, чтобы контролировать эпизоды кровотечения и уменьшить количество инъекций, которые необходимы во время хирургического вмешательства у пациентов с гемофилией В.

Для разработки FIX пролонгированного действия применяли технологию СТР. В частности, продление периода полужизни рекомбинантной молекулы rFIX осуществляли путем слияния по меньшей мере одного СТР человека с FIX. Рекомбинантный белок FIX-СТР экспрессировали в клетках млекопитающих и подвергали анализу *in vitro* и *in vivo*. Продemonстрировали, что активность rFIX-СТР *in vitro* была сравнима с rFIX. Исследования фармакокинетики и эффективности у крыс продемонстрировали улучшенные свойства rFIX-СТР. Результаты данного исследования продемонстрировали, что разработка молекулы rFIX с продленным периодом полужизни, обладающей кровоостанавливающими свойствами, близкими с таковыми у фермента дикого типа, практически осуществима.

Пример 2. Сравнительная оценка очищенного FIX-СТР<sub>3</sub> против FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>.

2.1. Цель исследования.

Сравнительная оценка фармакокинетических параметров FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub> после процесса частичной очистки.

2.2. Получение собранных FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>.

КДНК FIX (OriGene RC219065), слитую на С-конце с четырьмя или пятью последовательно присоединенными последовательностями СТР, экспрессировали в клетках Dg44, применяя систему экспрессии Excellgene, в присутствии 10 нг/л витамина К3 (Sigma, Mennadion). Кондиционированные среды собирали (300 мл), фильтровали и замораживали.

2.3. Получение собранного FIX-СТР<sub>3</sub>.

FIX-СТР<sub>3</sub> экспрессировали внутри хозяина в клетках CHO, применяя вектор pCI-DFIFR, клон 196, BR-9 в присутствии 25 нг/л витамина К3 (Sigma). Полученные суспензии клеток собирали и фильтровали.

Все образцы FIX-СТР (3, 4 и 5 СТР) очищали только на колонке Якалин, вследствие нехватки материала.

2.4. Определение уровня антигена FIX.

Уровень антигена FIX определяли с помощью набора для ELISA FIX человека (Affinity Biologics;

номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по четырем независимым экспериментам. Концентрация FIX-СТР<sub>3</sub> была немного выше по сравнению с двумя дополнительными вариантами (табл. 10).

Таблица 10. Уровень антигена FIX

	3 СТР	4 СТР	5 СТР
	Конечная	Конечная	Конечная
	Якалин40	Якалин40	Якалин40
Средняя (нг/мл)	1016,69	4644,11	1686,82
СО	225,41	925,63	160,07
% КВ	22,17	19,93	9,49

#### 2.5. Окрашивание кумасси и иммуноблоттинг FIX-СТР.

Собранные FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли методом вестерн-блотт(иммуноблоттинга), применяя поликлональные АТ к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gl $\alpha$  (American Diagnostica).

Как сообщалось ранее, FIX, слитый с тремя СТР, мигрировал на уровне 80 кДа, тогда как FIX, слитый с четырьмя или пятью СТР, мигрировал на уровне 85 кДа или 90 кДа, соответственно. Как и ожидалось, у собранных FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>, полученных от Excellgene, выявили очень низкие уровни гамма-карбоксилирования по сравнению с собранным FIX-СТР<sub>3</sub>, который получили от Prolog (фиг. 8).

После процесса очистки с применением колонки с якалином (иммуноаффинной очистки гликозилированных белков), FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Гели после ЭФ в ПААГ/ДСН окрашивали красителем кумасси бриллиантовым голубым для обнаружения образцов. У всех вариантов выявили гораздо более "чистые" профили полос (фиг. 9), что позволяет предложить повышение чистоты белков.

#### 2.6. Определение хромогенной активности FIX.

Сравнительную оценку активности *in vitro* полностью очищенных (на ГА-колонке) FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Готовили серийные разведения всех образцов, и оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости с таковой для эталонного препарата нормальной плазмы человека. Пониженная хромогенная активность FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> (фиг. 10) по сравнению с плазмой может быть следствием неправильных посттранскрипционных модификаций белков FIX, например, неподходящего гамма-карбоксилирования и отщепления пропептида или, в качестве альтернативы, следствием добавления кассет СТР. Изменение активности FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> (табл. 11) может быть вызвано неадекватными возможностями количественного анализа FIX с помощью ELISA вследствие маскировки СТР сайта антигена.

Таблица 11. Отношение ЕС50 образец/плазма

Образец	Отношение ЕС50 образец/плазма
Плазма	1
3 СТР, конечный, ГА	2
4 СТР, конечный, ГА	5,35
5 СТР, конечный, ГА	2,73

#### 2.7. Фармакокинетическое исследование.

Очищенные на колонке с Якалином FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> (группы А, В и С, соответственно) вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на группу лечения) в дозе 250 мкг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 и 96 ч после введения (табл. 12). Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

Таблица 12. План проведения ФК исследования

Группа лечения	Лечение	Количество животных/группу	Путь введения	Уровень дозы (мкг на животное)	Инъекционный объем (мл)	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (ч. после введения)
A	FIX-	6	в/в	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8,
	СТР*3 Якалин 40						24, 48, 72, 96
B	FIX- СТР*4 Якалин 40	6	в/в	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FIX- СТР*5 Якалин 40	6	в/в	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

Осуществляли количественный анализ концентрации FIX в образцах плазмы, применяя наборы для Elisa FIX человека (Affinity Biologics). Рассчитывали фармакокинетический профиль, который представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени. Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В табл. 13 ниже кратко описаны рассчитанные концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов.

Таблица 13. Рассчитанные концентрации FIX

Время (ч.)	Ср. 3 СТР нг/мл	СО 3 СТР	Ср. 4 СТР нг/мл	СО 4 СТР	Ср. 5 СТР нг/мл	СО 5 СТР
0,083	1087,82	72,39	904,54	21,06	1097,23	82,24
0,5	774,18	86,31	736,82	66,93	998,79	70,43
2	562,23	3,70	627,09	32,47	747,85	14,02
5	357,44	8,63	431,23	29,41	576,49	27,36
8	239,20	7,82	327,46	30,26	394,96	36,48
24	77,08	4,26	107,38	5,18	142,42	16,13
48	27,73	2,02	39,83	1,85	53,66	3,33
72	12,55	1,48	21,53	1,55	23,54	3,32
96	6,66	1,23	10,63	0,13	18,54	3,39

ФК профиль и краткое описание ФК параметров представлены ниже в табл. 14 и на фиг. 11. Полный профиль ФК-анализа во все моменты времени позволил предположить, что добавление к FIX 4 или 5 кассет СТР не увеличило период полужизни по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub>. AUC после введения FIX-СТР<sub>5</sub> увеличилась в 1,4-1,6 раз по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub>, но это увеличение не было статистически значимым.

Таблица 14. ФК профиль и краткое описание ФК параметров

24 - 96 ч.			
Период полужизни (ч.)	20,43	22,02	23,96
AUC (нг/ч/мл)	8218,38	10504,49	13329,41
Vd (мл/кг)	700,76	586,02	494,89
CL (мл/ч/кг)	23,77	18,45	14,32

Поскольку в образцах, полученных через 96 ч после введения, обнаружили очень низкие концентрации FIX, которые были на нижнем пределе количественного обнаружения анализа, конечный период полужизни рассчитали заново, осуществляя более точный и научно обоснованный расчет (табл. 15). Согласно данному расчету получили даже самые малые различия между периодами полужизни FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>.

Таблица 15. Рассчитанный заново конечный период полужизни

8 - 72 ч.	3 СТР	4 СТР	5 СТР
<b>Период полужизни (ч.)</b>	15,38	16,63	16,04

## 2.8. Выводы.

В данном исследовании оценивали фармакокинетические параметры и потенциальную свертывающую активность FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>. Слияние 4 и 5 СТР с FIX не обеспечивало улучшение или продление периода полужизни, по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub>, и наблюдалось снижение хромогенной активности. В табл. 16 ниже кратко описаны процентные улучшения периода полужизни для различных слитых вариантов FIX-СТР (от 1 до 5 СТР). Слияние СТР с FIX улучшало его фармакокинетические свойства, но, непредвиденно, данное улучшение было ограниченным. Неожиданно, после последовательного присоединения 3, 4 или 5 СТР к FIX, были рассчитаны аналогичные значения периодов полужизни.

Таблица 16. Краткое описание процентного улучшения периода полужизни

Вариант FIX	T <sub>1/2</sub> (8 - 72 ч.) % увеличения
rhFIX по сравнению с 1СТР	112
1СТР по сравнению с 2СТР	141
2СТР по сравнению с 3СТР	37
3СТР по сравнению с 4СТР	6
4СТР по сравнению с 5СТР	0

Полученные результаты позволяют предположить, что слияние 3 СТР с FIX вызывало максимальное улучшение периода полужизни белка, подтверждая, что FIX-СТР<sub>3</sub> представляет собой оптимальный вариант с точки зрения периода полужизни, структуры и потенциальной свертывающей активности для дальнейшей клинической разработки.

Пример 3. Лечение FIX-СТР<sub>3</sub> на примере FIX-/- гемофильной модели на мышах.

Как описано выше, проводили исследование, в котором тестировали ФК профиль и коагулирующую активность собранных FIX-СТР, FIX-СТР<sub>2</sub> и FIX-СТР<sub>3</sub> по сравнению с rhFIX. FIX-СТР<sub>3</sub> проявил улучшенный ФК профиль, при этом сохранив коагулирующую активность, по сравнению с собранными FIX-СТР<sub>1</sub> и FIX-СТР<sub>2</sub> или rhFIX. Для того чтобы дополнительно оценить полученный результат, очищали белок FIX-СТР<sub>3</sub> с остатками гамма-карбоксиглутамата. После однократного в/в введения FIX-СТР<sub>3</sub> нормальным крысам выявили 3-кратное увеличение периода полужизни и 4,5-кратное увеличение AUC по сравнению с rhFIX. Для FIX-СТР<sub>3</sub> продемонстрировали пониженную хромогенную и свертывающую активность *in vitro*, наиболее вероятно вследствие недостаточного отщепления аминоконцевого пропептида и неподходящих посттранскрипционных модификаций (ПТМ), таких как неподходящее гамма-карбоксилирование.

В настоящем исследовании изучали фармакокинетические и фармакодинамические свойства рекомбинантного FIX человека, слитого с тремя последовательно присоединенными СТР, у мышей, лишенных FIX.

Цель исследования.

Определить фармакокинетические и фармакодинамические параметры rFIX-(СТР)<sub>3</sub> по сравнению с доступным для приобретения rhFIX (BeneFIX®) у мышей, лишенных FIX, после однократного в/в введения FIX-(СТР)<sub>3</sub> при аналогичной удельной активности и дозе (аналогичной удельной активности для ФД и аналогичных параметрах FIX для ФК).

Получение собранного FIX-СТР<sub>3</sub>.

КДНК FIX (OriGene RC219065-Thr 148), к С-концу которой последовательно присоединены три последовательности СТР, экспрессировали в клетках Dg44, применяя систему экспрессии Excellgene, в присутствии 25 нг/мл витамина К3 (Sigma, Mennadion). Пять отдельных партий, содержащих по 5 л суспензии клеток, культивировали (всего двадцать пять литров) и собирали после снижения жизнеспособности до 60-70%. Собранные суспензии фильтровали и замораживали при -70°C.

Определение уровня собранного антигена FIX.

Уровень собранного антигена FIX определяли с помощью набора для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Уровень антигена рассчитывали для каждой партии. Концентрация FIX сохранялась среди различных партий (табл. 17).

Таблица 17. Уровень антигена FIX

Уровень антигена FIX			
Партия	1	2	3
Сред. (мкг/мл)	28,81	32,74	42,9
СО	2,5	2,69	4,0
% КВ	8,84	8,38,2	9,4

Процесс очистки FIX-СТР<sub>3</sub>.

После короткого исследования очистки осуществляли процесс очистки, применяя следующие 3 колонки: диэтиламиноэтанол (ДЭАЭ)-сефароза, гепарин-сефароза и керамический гидроксиапатит (ГА) 1 типа Bio Rad (40 мкм). Очищали обогащенный гамма-карбокситированный белок FIX-СТР<sub>3</sub>. Вкратце: пять литров осветленной собранной суспензии клеток размораживали при 4°C в течение 4 дней. Для каждой партии очистки, осветленную собранную суспензию клеток (2 литра) концентрировали в 4 раза и диализовали против 20 мМ трис-НСl pH 8,2, применяя одноразовый картридж из полого волокна с номинальной отсечкой по молекулярной массе 10 кДа. Данный процесс (УФ-ДФ1) осуществляли дважды, один литр УФ-ДФ1 загружали на колонку с ДЭАЭ-сефарозой, и фактор IX элюировали 20 мМ трис-НСl, 200 мМ NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 8,2. Полученный продукт разбавляли 1:1 20 мМ трис-НСl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5, и pH подвели до 7,5 перед загрузкой на колонку с гепарин-сефарозой. Элюирование осуществляли 20 мМ трис-НСl, 300 мМ NaCl и 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5. Элюированный продукт концентрировали и диализовали против 10 мМ фосфата, pH 6,8, применяя кассету Pellicon XL с мембраной с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (УФ-ДФ2). Полученный продукт загружали на ГА-колонку и активированную фракцию фактора IX элюировали 150 мМ фосфатом, pH 6,8. Очищенный продукт концентрировали до целевой концентрации, равной 2 мг/мл, диализовали против трис-буферного раствора (TBS), pH 7,45, разделяли на аликвоты и хранили при -70°C.

Процесс очистки повторяли пять раз, еженедельно, чтобы очистить весь объем (25 литров). Процессы очистки назвали ГА№ 6-10. Каждый очищенный продукт оценивали отдельно (прил. № 1-5). По окончании процесса очистки, различные партии объединяли и дополнительно концентрировали до целевой концентрации, равной 4 мг/мл.

Аналитические свойства FIX-СТР<sub>3</sub>.

Определение уровня антигена FIX.

Антигенный уровень обогащенного гамма-карбокситированного белка FIX-СТР<sub>3</sub> определяли с применением набора для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам (табл. 18).

Таблица 18. Уровень антигена FIX-СТР<sub>3</sub>

ELISA №1 очищенного на ГА-колонке FIX-СТР <sub>3</sub>				ELISA №2 очищенного на ГА-колонке FIX-СТР <sub>3</sub>				Конечный, сред.
Разб.	1	2	Сред.	Разб.	1	2	Сред.	
130000	3412240	3781830	3597035	130000	3692260	3568240	3630250	3613643
260000	3915600	4158440	4037020	260000	3706820	3595540	3651180	3844100
520000	4158544	4334096	4246320	520000	3831464	3530748	3681106	3963713
1040000	4096352	4004104	4050228	1040000	3863392	3684304	3773848	3912038
Сред. (нг/мл)	3895684	4069618	3982651	Сред. (нг/мл)	3773484	3594708	3684096	3833373
СО	338367,5	234486,7	274313,5	СО	86576,66	65369,65	63369,86	154459,6
% КВ	8,685703	5,761884	6,887712	% КВ	2,294343	1,818497	1,720092	4,029338
Сред. (мг/мл)	3,895684	4,069618	3,982651	Сред. (мг/мл)	3,773484	3,594708	3,684096	3,833373

ELISA №1 очищенного на ГА-колонке FIX-СТP <sub>3</sub>				ELISA №2 очищенного на ГА-колонке FIX-СТP <sub>3</sub>				Конечный, сред.
Разб.	1	2	Сред.	Разб.	1	2	Сред.	
130000	3412240	3781830	3597035	130000	3692260	3568240	3630250	3613643
260000	3915600	4158440	4037020	260000	3706820	3595540	3651180	3844100
520000	4158544	4334096	4246320	520000	3831464	3530748	3681106	3963713
1040000	4096352	4004104	4050228	1040000	3863392	3684304	3773848	3912038
Сред. (нг/мл)	3895684	4069618	3982651	Сред. (нг/мл)	3773484	3594708	3684096	3833373
СО	338367,5	234486,7	274313,5	СО	86576,66	65369,65	63369,86	154459,6
%КВ	8,685703	5,761884	6,887712	%КВ	2,294343	1,818497	1,720092	4,029338
Сред. (мг/мл)	3,895684	4,069618	3,982651	Сред. (мг/мл)	3,773484	3,594708	3,684096	3,833373

Блоты гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН.

Обогащенный гамма-карбоксилированный белок FIX-СТP<sub>3</sub>, rhFIX и rFIXa (активированный FIX) загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ с помощью окрашивания кумасси геля после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым голубым (800 нг белка) (фиг. 12). Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) осуществляли, применяя 100 нг белка, с помощью поликлональных АТ к FIX человека (фиг. 12В), моноклонального антитела, узнающего гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499, 3570) (фиг. 12С), поликлональных АТ к пропептиду FIX (фиг. 12D) и поликлональных АТ к СТP (фиг. 12E). Ранее сообщали, что FIX-СТP<sub>3</sub> мигрировал на уровне 75 кДа.

Процедура очистки значительно обогатила содержание FIX-СТP<sub>3</sub>, при этом уменьшив количество примесей. Выход процесса очистки был очень низким и находился в диапазоне около 2-3% (результаты не представлены) вследствие необходимости сбора только гамма-карбоксилированных фракций FIX-СТP<sub>3</sub>, что продемонстрировано на иммуноблоте, окрашенном антителами к GlA (фиг. 12В). На основании окрашивания кумасси и иммуноблоттинга FIX выявили, что FIX-СТP<sub>3</sub> составлял лишь приблизительно 60-70%, также были обнаружены дополнительные полосы с меньшей молекулярной массой, предположительно, менее гликозилированные формы.

Свертывающая активность FIX-СТP<sub>3</sub>.

Хромогенная активность FIX-СТP<sub>3</sub>.

Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* собранного FIX-СТP<sub>3</sub> и обогащенного гамма-карбоксилированного белка FIX-СТP<sub>3</sub>, по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности ВЮРНЕН (Nurphen BioMed 221802). Готовили серийные разведения собранного FIX-СТP<sub>3</sub> и очищенного белка FIX-СТP<sub>3</sub> и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарственного средства, состоящего из нормальной плазмы человека. Ранее продемонстрировали, что собранный FIX-СТP<sub>3</sub> был в 50 раз менее активным, чем объединенная плазма человека (табл. 19, фиг. 13). После очистки FIX-СТP<sub>3</sub>, хромогенная активность значительно улучшилась и была лишь в 4,72 раза меньше, чем активность объединенной плазмы человека (табл. 19, фиг. 13). Снижение хромогенной активности собранного FIX может быть следствием неправильных посттранскрипционных модификаций вариантов белка FIX, например неподходящего гамма-карбоксилирования и отщепления пропептида. После очистки и обогащения гамма-карбоксилированной фракцией FIX-СТP<sub>3</sub>, активность улучшилась, демонстрируя существенный вклад гамма-карбоксилирования в активность FIX.

Таблица 19. Хромогенная активность FIX-СТP<sub>3</sub>

Образец	ЕС <sub>50</sub> (нг/мл)	Отношение ЕС <sub>50</sub> образец /плазма
Собранный FIX-СТP <sub>3</sub>	741,3	54,4
Очищ. FIX-СТP <sub>3</sub>	64,6	4,72
Плазма	13,63	1

Одностадийный анализ свертывания крови (АЧТВ).

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является мерой целостности внутреннего и общего путей каскада свертывания крови. АЧТВ представляет собой время в секундах свертывания плазмы после добавления активатора внутреннего пути, фосфолипида и кальция. Основной целью

данного анализа является количественное определение способности FIX-СТP<sub>3</sub> восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FIX, при добавлении rhFIX. 200 мкл плазмы человека, обедненной FIX, смешивали с 25 мкг/мл FIX-СТP<sub>3</sub> и дополнительно разбавляли в TBS. После инкубации в течение 60 секунд при 37°C, в смесь добавляли 50 мкл активатора ЧТВ (Actin FS) и 50 мкл 25 мМ кальция, и определяли время свертывания крови в секундах с применением коагулометра Sysmex® CA 1500 (выполняли в больнице Шибы, в Национальном центре свертывания крови, применяя утвержденный анализ АЧТВ). Оценивали эффективность путем сравнения FIX-СТP<sub>3</sub> с кривой дозовой зависимости эталонного препарата объединенной нормальной плазмы человека. Результаты выражали в виде процента активности, интерполированного по стандартной кривой, покрывающей уровни FIX <1 - 110%. Выявили 15-20-кратное снижение коагулирующей активности FIX-СТP<sub>3</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, поскольку было показано, что активность при концентрации 5 мкг/мл, которая является нормальной концентрацией FIX в организме, составила 6,5% (табл. 20).

Таблица 20. Свертывающая активность FIX-СТP<sub>3</sub>

FIX-СТP <sub>3</sub>	Концентрация FIX от поставщика (мкг/мл)	Концентрация в исследованном образце (мкг/мл)	% активности FIX (нормированный на активность объединенной нормальной плазмы человека)
	3,83		25
5			6,5

FIX-СТP<sub>3</sub> также проявил повышенное время свертывания крови по сравнению с BeneFIX® (табл. 21 и фиг. 14).

Таблица 21. Сравнительное время свертывания крови (АЧТВ)

	Время свертывания крови	
	FIX-СТP <sub>3</sub>	BeneFIX®
38 мкг/мл	77,6	
19 мкг/мл	83,4	
7,6 мкг/мл	93,2	50,6
3,8 мкг/мл	104,8	57,6
1,9 мкг/мл	112,2	63,7
0,95 мкг/мл	122,6	71,5
0,475 мкг/мл		83,7
0,238 мкг/мл		94,3

Дополнительный анализ свертывания крови был проведен независимо на мышах с дефицитом FIX доктором Paul Monahan в Университете Северной Каролины перед началом исследования ФК-ФД. Результаты анализа АЧТВ позволили предположить, что коагулирующая активность FIX-СТP<sub>3</sub> была в 40 раз меньше, чем таковая у объединенной нормальной плазмы человека, что продемонстрировали необходимостью более длительного периода (измеренного в секундах) и более высокой концентрации для достаточной свертывающей активности (табл. 22).

Таблица 22. Сравнительная свертывающая активность

	Активность FIX (единицы)	
	FIX-СТP <sub>3</sub>	BeneFIX®
38 мкг/мл	13,9	
19 мкг/мл	8,8	
7,6 мкг/мл	4	116,8
3,8 мкг/мл	1,6	67,4
1,9 мкг/мл	0,9	41,7
0,95 мкг/мл	0,4	22,4
0,475 мкг/мл		8,5
0,238 мкг/мл		3,7

Удельная активность (ед./мл), которую рассчитывали на основании уровня антигена FIX, что рассчитывали с помощью ELISA для FIX-СТP<sub>3</sub> и BeneFIX®, составляла 4,46 и 198,9 соответственно.

Несоответствие рассчитанной активности FIX-СТP<sub>3</sub>, продемонстрированной в хромогенном анализе по сравнению с анализом АЧТВ можно объяснить повышенной чувствительностью анализа АЧТВ и значимостью анализа in vivo. В анализе хромогенной активности, присутствует избыточное количество реагентов и ферментов, которые могут активировать менее эффективные варианты FIX. Различия в значениях удельной активности FIX-СТP можно объяснить применением различных реагентов и автоматизированных устройств. Значение активности, рассчитанное в Университете Северной Каролины, использовали для дизайна исследования ФК-ФД.

Детектирование белка FIXa.

Чтобы подтвердить, что после процесса очистки активация FIX (FIXa) не произошла, осуществляли

анализ детектирования FIXa, применяя хромогенный анализ FIXa Biophen (номер в каталоге 221812). В данном анализе измеряют количество FIXa, присутствующего в конкретном образце, применяя каскад хромогенной активности, описанный ранее. FIX-СТP<sub>3</sub> и rhFIX разбавляли и оценивали уровни FIXa. FIX-СТP<sub>3</sub> не активировался в процессе очистки или хранения (табл. 23).

Таблица 23. Детектирование FIXa

Образец	FIX-СТP <sub>3</sub>	rhFIX
Исходная конц. (мг/мл)	1000	5,7
rFIXa (мг/мл)	НПКО	0,00487
% FIXa в образце	НПКО	0,085

Исследование ФК-ФД FIX-СТP<sub>3</sub>.

FIX-СТP<sub>3</sub> и rhFIX (BeneFIX®) вводили однократной внутривенной инъекцией мышам C57Bl, лишенным FIX, в дозе 625 мкг/кг массы тела, содержащей 100 МЕ FIX/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 мышей поочередно через 0,25, 4, 24, 48, 72 и 96 ч после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Оценивали уровень антигена hFIX, и осуществляли тщательный ФК-анализ. Чтобы оценить способность FIX-СТP<sub>3</sub> продливать свертывающую активность у животных, лишенных FIX, по сравнению с BeneFIX®, рассчитывали активность FIX в образцах цитратной плазмы, собранных у мышей FIX<sup>-/-</sup>, подвергнутых лечению, применяя автоматизированный анализ активности FIX (табл. 24).

Таблица 24. Схема исследования

	Продукт	Введение	Доза	Кол-во мышей	Точки сбора (ч. после введения)	Необходимое количество
**Группа 1	FIX-СТP <sub>3</sub>	Однократная доза: в/в	100 МЕ/кг 2,5 МЕ/мышь (553 мкг/мышь)	12 мышей	0,25, 1, 4, 8, 16, 24, 48	6636 мкг
Группа 2	FIX-СТP <sub>3</sub>	Однократная доза: в/в	**472 мкг/кг 12,57 мкг/мышь	18 мышей	*0,25, 1*, 4*, 8*, 16*, 24*, 48*, 72*, 96*	200 мкг 12,57 мкг/мышь
**Группа 3	BeneFIX®	Однократная доза: в/в	100 МЕ/кг 2,5 МЕ/мышь	18 мышей	0,25, 1, 4, 8, 16, 24, 48, *72, *96	226,3 мкг 12,57 мкг/мышь

\* Только точки сбора результатов ФК

\*\* Кровотечение из хвостовой вены через T=48 ч после введения; группы 1 и 3

Фармакокинетический профиль FIX-СТP<sub>3</sub> у мышей FIX<sup>-/-</sup>.

Концентрацию FIX рассчитывали, применяя наборы для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по трем животным в каждый момент времени. Ниже в табл. 25 и на фиг. 15 кратко описаны рассчитанные концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов для групп 1 и 3. ФК профиль и краткое описание ФК параметров представлены ниже (табл. 26 и 27). Анализ ФК также осуществляли для группы №2, чтобы проверить воздействие (результаты не представлены).

Таблица 25. Концентрации FIX

Момент времени (ч.)	FIX-СТР <sub>3</sub> нг/мл	BeneFIX® нг/мл
0,25	3645,397	2823,023
1	2411,09	2416,248
4	1703,205	1506,228
8	1139,736	864,764
16	415,32	347,465
24	238,37	158,7973
36	141,0105	94,40067
48	95,461	42,28833
72	76,90953	11,87567
96	24,955	НПКО

Двухкомпарментный модуль (программного обеспечения WinLin) применяли для определения  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{конеч.}$  и клиренса (CL). ФК параметры описаны ниже в табл. 26.

Таблица 26. ФК свойства

Вариант FIX	$T_{1/2\alpha}$ (1/ч.)	$T_{1/2\beta}$ (1/ч.)	AUC нг/мл*ч.	CL мл/кг/ч.	MRT (ч.)	V <sub>ss</sub> (мл/кг)
BeneFIX®	3,4	12,7	22428	29	11,5	320,8
FIX-СТР <sub>3</sub>	4	28,7	31770	19	22	425,2

V<sub>ss</sub> - стационарный объем распределения.

Добавление трех "кассет" СТР к rhFIX удлиняло период полужизни FIX in vivo по меньшей мере в 2,5 раза. AUC после введения FIX-СТР<sub>3</sub> in vivo возрастала в 2 раза по сравнению с введением rhFIX. У мышей, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, продемонстрировали улучшенный ФК профиль по сравнению с мышами, которым вводили BeneFIX®.

Фармакодинамический профиль FIX-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FIX.

Параллельно с взятием образцов на ФК, у образцов цитратной плазмы животных, лишенных FIX, которым вводили либо BeneFIX®, либо FIX-СТР<sub>3</sub>, оценивали свертывающую активность с помощью анализа АЧТВ, результаты которого преобразовывали в % активности в каждый момент сбора рассчитывали как текущее время свертывания/время свертывания объединенной нормальной плазмы мыши\*100. В табл. 27 кратко описаны значения активности после введения либо BeneFIX®, либо FIX-СТР<sub>3</sub>.

После введения FIX-СТР<sub>3</sub>, значительная свертывающая активность была обнаружена через один час после введения, достигая активности 96% через 4 ч после введения, тогда как наивысшее значение активности BeneFIX® составляло 40% (табл. 27, фиг. 16). Свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub> поддерживалась в течение более продолжительного периода времени, демонстрируя продленную активность. Свертывающая активность у мышей, которых лечили BeneFIX®, не детектировалась в моменты времени после 36 ч, тогда как у мышей, которых лечили FIX-СТР<sub>3</sub>, продолжала сохраняться измеримая активность через 72 ч после введения (табл. 27, фиг. 16). Анализ фармакокинетического профиля % свертывания позволяет предположить, что свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub> сохраняется в течение значительно более продолжительного периода времени, и его период полужизни почти в 2 раза выше, чем у BeneFIX® (табл. 28).

Таблица 27. % активности FIX

Ч. после введения	% активности BeneFIX®	% активности FIX-СТР <sub>3</sub>
0,25	39,9	1,0
1	33,4	15,5
4	24,9	93,6
8	18,8	65,2
16	10,3	39,9
24	1,7	11,9
36	1,4	11,0
48	<1	4,6
72	<1	1,4

Таблица 28. Свертывающая активность

Вариант	T½ $\alpha$ (1/ч.)	T½ $\beta$ (1/ч.)
<b>BeneFIX®</b>	5,7	-----
<b>FIX-СТР<sub>3</sub></b>	7,3	16

Тест на кровотечение у мышей, лишенных FIX.

Мышам с дефицитом FIX вводили однократную внутривенную инъекцию 100 МЕ/кг BeneFIX® или rFIX-СТР<sub>3</sub>. Хвостовую вену слегка рассекали через 48 ч после введения и оценивали время кровотечения из хвостовой вены (ВКХВ) и интенсивность кровотечения (О.П. гемоглобина). Второй тест с кровотечением проводили через 15 мин после достижения гомеостаза и измеряли те же параметры. После первого теста с кровотечением у животных, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, было значительно менее интенсивным, чем кровотечение у животных, которым вводили BeneFIX®, что продемонстрировали с помощью значений О.П. гемоглобина (фиг. 17).

Поскольку ранее было описано, что в процессе первого теста с кровотечением у мышей с гемофилией время кровотечения не обязательно коррелирует с эффективностью лечения, рекомендуется оценить гомеостаз после дополнительного кровотечения. Как только первое кровотечение остановилось самопроизвольно или было остановлено вручную, осуществляли второе тест с кровотечением через 15 мин после первого и заново измеряли время и интенсивность кровотечения. Во время второго эпизода кровотечения у животных, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, время и интенсивность кровотечения были меньше, демонстрируя, что FIX-СТР<sub>3</sub> был эффективен в более поздние моменты времени (фиг. 18).

Наконец, за животными далее наблюдали в течение 12 ч после второго теста с кровотечением, и все повторения эпизодов кровотечения были зафиксированы. Животные, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, оказались способны поддерживать гомеостаз крови в течение следующих 12 ч, без повторения эпизодов кровотечения. Наоборот, у 50% мышей, которых лечили BeneFIX®, наблюдались спонтанные эпизоды кровотечения из хвоста (табл. 29).

Таблица 29. Результат через 12 ч после рассечения хвоста

Группа мышей	Отсроченное повторное кровотечение	Смерть или сильное нарушение, требующее эвтаназии
<b>FIX-СТР<sub>3</sub> (100 МЕ/кг)</b>	0/5 (0%)	0/5
<b>BeneFIX® (100 МЕ/кг)</b>	3/6 (50%)	0/6
<b>FIX-/- (не лечили)</b>	5/6 (100%)	1/6

Рекомбинантный FIX-СТР<sub>3</sub>, слитый белок, состоящий из одной молекулы FIX, слитой с последовательно присоединенными тремя "кассетами" СТР, разработали, чтобы решить проблему короткого периода полужизни доступных на сегодняшний день продуктов FIX, применяемых для лечения пациентов с гемофилией В. Мы продемонстрировали, что период полужизни rFIX-СТР<sub>3</sub> был стабильно в 2,5-4 раза больше, чем для rFIX у крыс (как сообщали ранее) и у мышей, лишенных FIX. Без привязки к какой-либо конкретной теории, слитый белок уменьшал клиренс FIX и защищал FIX от активности протеаз, деградации благодаря маскированию и уменьшал аффинность FIX к рецепторам печени. В совокупности данные свойства домена СТР увеличивают период полужизни FIX.

В дополнение к фармакокинетическому анализу rFIX-СТР<sub>3</sub> мы исследовали фармакодинамические свойства FIX-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FIX. rFIX-СТР<sub>3</sub> и rFIX вводили в сопоставимых дозах (в единицах), чтобы компенсировать недостаточность свертывания крови уровни у мышей, лишенных FIX. Тем не менее, действие rFIX-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FIX, значительно увеличивалось, по меньшей мере до 76 ч после введения, достигая более высокого пика активности. Свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub> начала проявляться с задержкой в 1 ч по сравнению с BeneFIX®. Активация FIX может быть необходима, поскольку добавление трех последовательно присоединенных СТР теоретически может маскировать сайт активации и задерживать начало каскада. После введения FIX-СТР<sub>3</sub>, наблюдали пик 100% активности, тогда как активность BeneFIX® составляла лишь 40%. Более высокая исходная активность является очень важным параметром, было продемонстрировано, что добавление 3 СТР потенциально может улучшить выход.

Целью профилактической заместительной терапии FIX пациентов с гемофилией В является поддержание в плазме 1-2% уровня нормальной свертывающей активности. Анализ кровотечения из хвостовой вены представляет собой чувствительный тест *in vivo*, позволяющий измерить способность поддержания гомеостаза свертывания крови при низких значениях активности, имитируя модель гомеостаза

свертывания крови у человека. В ответ на тест с кровотечением из хвостовой вены через 48 ч после введения у животных, которым вводили rFIX-СТР<sub>3</sub>, поддерживался гомеостаз свертывания крови с более короткими и менее тяжелыми эпизодами кровотечения, демонстрируя продленную свертывающую активность.

FIX представляет собой сложный белок, который содержит множество функциональных доменов, которые подвергаются большому количеству посттрансляционных модификаций. Одна из необходимых для активности FIX посттрансляционных модификаций представляет собой гамма-карбоксилирование первых 12 глутаминовых кислот в домене Gla зависимой от витамина К гамма-глутамилкарбоксилазой. Данная модификация способствует связыванию FIX с фосфолипидными мембранами и, таким образом, важна для его функционирования. FIX, который не гамма-карбоксилирован, не функционален, и, следовательно, гамма-карбоксилирование представляет собой стадию, лимитирующую скорость реакции.

Данное исследование ФК-ФД осуществляли, применяя временно трансфицированные клетки. Обширную аналитическую оценку посттрансляционных модификаций выполняли на стабильном белке FIX-СТР<sub>3</sub>, продуцированном и секретируемом стабильным оптимизированным клоном.

На основании представленных результатов фактор свертывания крови FIX-СТР<sub>3</sub> потенциально может уменьшить частоту инъекций пациентам, получающим рутинные профилактические дозы FIX-заместительной терапии. Ожидается, что rFIX-СТР<sub>3</sub> может обеспечивать пролонгированную защиту от кровотечения после каждого введения фактора, уменьшать общее количество единиц фактора, необходимых для лечения эпизодов кровотечения, и/или сохранять достаточный гемостаз при проведении хирургических процедур после меньшего количества инъекций.

Пример 4. Получение и применение фактора свертывания крови FVII.

Версия активированного фактора свертывания крови VII (FVIIa) пролонгированного действия будет полезна для лечения пациентов с гемофилией А и В. Рекомбинантный белок FVIIa-СТР<sub>3</sub> обладает клиническим потенциалом для улучшения лечения пациентов с гемофилией путем уменьшения частоты инфузий и даже путем уменьшения нагрузки лекарственного средства, делая возможным подход профилактического лечения, который может значительно улучшить качество жизни пациента, избежать спонтанных эпизодов кровотечения и накопления повреждения суставов и других органов.

В настоящем тексте описано получение рекомбинантной молекулы FVIIa-СТР с продленным периодом полужизни, основанное на слиянии FVII с СТР человека. Рекомбинантный FVIIa-СТР экспрессировали в клетках млекопитающих и охарактеризовали *in vitro* и *in vivo*. Продемонстрировали, что активность rFVII-СТР была сравнима с rFVII. Исследования фармакокинетики и эффективности у крыс продемонстрировали улучшенные свойства rFVII-СТР. Результаты данного исследования продемонстрировали, что разработка молекулы rFVIIa с продленным периодом полужизни и с кровоостанавливающими свойствами, очень близкими ферменту дикого типа, практически осуществима.

Клонирование и экспрессия рекомбинантной молекулы FVII.

Сконструировали несколько клонов фактора VII в нашем эукариотическом векторе экспрессии (pCI-dhfr) (фиг. 19). Проверенный MGC клон кДНК FL человека (IRCM), включающий последовательность фактора свертывания крови VII *homo sapiens*, заказали в "Open Biosystems" (OB-MHS4426). Следующие праймеры были синтезированы в Sigma-Genosys со следующими последовательностями: праймер 67: 5'CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCC3' (включает 5'-конец ДНК фактора VII и сайт рестрикции XhoI) (SEQ ID NO: 5); праймер 68<sup>R</sup>: 5'TCTAGAATAGGTATTTTCCACATG3' (включает сайт рестрикции XbaI) (SEQ ID NO: 6); праймер 69: 5' TCTAGAAAAAAGAAATGCCAGC3' (включает сайт рестрикции XbaI) (SEQ ID NO: 7); и праймер 70<sup>R</sup>: 5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAAATGGGGCTCGCA3' (включает 3'-конец ДНК фактора VII и сайт рестрикции NotI) (SEQ ID NO: 8).

Клонирование осуществляли двумя сериями реакций ПЦР. Первую реакцию осуществляли с праймером 67 и праймером 68<sup>R</sup>, используя плазмиду кДНК с последовательностью фактора VII (OB-MHS4426) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~534 п.о., выделили его и лигировали в клонирующий вектор TA (Invitrogen, номер в каталоге: K2000-01). Выделили фрагмент XhoI-XbaI, включающий последовательность N-конца фактора VII. Вторую реакцию осуществляли с праймером 69 и праймером 70<sup>R</sup>, и снова плазмиду кДНК с последовательностью фактора VII (OB-MHS4426) использовали в качестве матрицы. В результате амплификации ПЦР получили продукт ~813 п.о. и лигировали его в клонирующий вектор TA (Invitrogen, номер в каталоге: K2000-01). Выделили фрагмент XbaI-NotI, включающий последовательность карбоксильного конца фактора VII. Полученные два фрагмента встраивали в наш эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr (тройное лигирование) с получением клона 501-0-p136-1.

Плазмиду 501-p136-1 (фактор VII в векторе pCI-dhfr) расщепляли ферментами рестрикции XhoI и KpnI. Выделяли фрагмент размером ~1186 п.о. Частичный клон фактора VII (1180 п.о. -1322 п.о.), за которым следовала последовательность СТР, терминирующая последовательность и последовательность NotI, который синтезировали в GeneArt (0721543), расщепляли ферментами рестрикции KpnI и NotI. Выделяли фрагмент размером ~253 п.о. Полученные два фрагмента встраивали в наш эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr (тройное лигирование) с получением клона 501-1-p137-2. pCI-dhfr-701-2-p24-2 расщепляли ферментами рестрикции XhoI и ApaI и выделяли большой фрагмент (вектор).

pCI-dhfr-501-2-p137-2 (фактор VII-стр x1) расщепляли ферментами рестрикции XhoI и ApaI и выделяли вставку размером ~1200 п.о. Вектор и вставку лигировали с получением 501-2-p139-2. Клетки Dg44 высевали на чашки для культивирования клеток размером 100 мм и растили до конfluenceности 50-60%. Всего 2 мкг ДНК использовали для трансфекции одной 100 мм чашки, применяя реагент FuGene (Roche) в безбелковой среде (Invitrogen CD Dg44). Среду удаляли через 48 ч после трансфекции и заменяли на безбелковую среду (Invitrogen CD Dg44) без нуклеозидов. Через 14 дней, популяцию трансфицированных клеток переносили во флаконы для культивирования клеток T25, и селекцию продолжали в течение 10-14 дней до тех пор, пока клетки не начали хорошо расти как стабильные клоны. Выбирали клоны с высоким уровнем экспрессии и приблизительно  $2 \times 10^7$  клеток использовали для инокуляции 300 мл ростовой среды, в роллерной бутылки 1700 см<sup>2</sup> (Corning, Корнинг, Нью-Йорк), дополненной 5 нг/мл витамина К3 (менадина натрия бисульфата; Sigma). Кондиционированную среду собирали после быстрого снижения жизнеспособности клеток до приблизительно 70%. Кондиционированную среду сначала осветляли, а затем концентрировали приблизительно в 20 раз и диализовали против ФБР, применяя проточную фильтрационную кассету (с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа; Millipore Corp, Биллерика, Массачусетс).

Определение уровня антигена FVII.

кДНК, кодирующую пептид СТР, соединяли с 3'-концом кДНК, кодирующей FVII человека. Соответствующей конструкцией гFVII трансфицировали клетки Dg44. В качестве контроля использовали кДНК гFVII человека. Кондиционированную среду собирали, концентрировали, и далее оценивали секретированный рекомбинантный FVII. Уровни антигенов гFVII, гFVII-СТР и гFVII-СТР-СТР определяли с помощью набора для ELISA FVII человека AssayMax (AssayPro) (фиг. 20А). Не наблюдали значимого различия в уровне секреции гFVII-СТР и гFVII-(СТР)<sub>2</sub> по сравнению с нативным гFVII.

Блоты гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН.

Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли путем загрузки 50 нг либо собранного, либо очищенного, либо активированного белка гFVII. Образцы загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ геля после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли путем иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя моноклональное антитело к FVII человека (АТ) (R&D Systems) или поликлональное антитело к СТР, полученное в кролике.

Уровень антигена гFVII коррелировал с обнаруженным уровнем белка на гелях после ЭФ в ПААГ/ДСН, подвергнутых иммуноблоттингу с АТ к FVII. гFVII-СТР мигрировал в виде одной полосы, тогда как соответствующая молекулярная масса контроля FVII составляла приблизительно 52 кДа (результаты не представлены). Оба белка реагировали с антителами, специфичными к FVII, на иммуноблотах. гFVII-СТР также реагировал с антителами, специфичными к СТР. гFVII секретировался в виде зимогена, при этом не было и следа активированного белка.

Хромогенная активность FVII.

Активности собранных гFVII, гFVII-СТР и гFVII-(СТР)<sub>2</sub> определяли, применяя доступный для приобретения набор для хромогенного анализа (набор AssaySense для анализа хромогенной активности FVII человека (AssayPro)). Для функциональной характеристики гFVII-СТР и его способности в дальнейшем активироваться (FVIIa), концентрированный собранный гFVII-СТР помещали в доступный для приобретения набор для хромогенного анализа, который позволяет измерить способность TF/FVIIa активировать фактор X в фактор Xa, в результате чего в присутствии специфичного субстрата FXa высвобождает сигнал, количество которого определяют (AssayPro). Добавление пептида СТР к С-концу белка гFVII не нарушало активность FVII как сериновой протеазы (фиг. 20В, 20С).

Свертывающая активность FVII.

Протромбиновое время (ПВ) является мерой внешнего пути свертывания крови. ПВ представляет собой время (измеренное в секундах), которое требуется плазме для свертывания после добавления активатора внешнего пути, фосфолипида и кальция. Его используют для определения склонности крови к сворачиванию, в частности, для измерения дозировки варфарина, повреждения печени и статуса по витамину К. Эталонный диапазон для протромбинового времени обычно составляет приблизительно 12-15 с. В частности, в данном анализе осуществляли количественное определение способности собранных FVII-СТР и FVII-(СТР)<sub>2</sub> восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FVII, путем добавления гhFVII. 300 мкл плазмы человека, обедненной FVII, смешивали с 100 мкл собранных FVII, FVII-СТР и FVII-(СТР)<sub>2</sub> при определенных концентрациях, или объединенной нормальной плазмы человека, и дополнительно разбавляли. После инкубации в течение 60 с при 37°C, в смесь добавляли тканевый фактор (TF), CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды. Определяли время свертывания крови в секундах. Эффективность оценивали путем сравнения кривой дозовой зависимости собранных FVII-СТР и FVII-(СТР)<sub>2</sub> с эталонным препаратом, состоящим из гhFVII или объединенной плазмы человека. За одну единицу активного FVII принимали такое количество FVII, активность которого была равна активности одного мл нормальной плазмы человека. ПВ свертывающей активности гFVII и гFVII-СТР измеряли на коагулометре (Instrumentation Laboratory).

Ранее показали, что добавление пептида СТР к С-концу белка гFVII не нарушало его активность как сериновой протеазы и приводило к стимуляции и активации нативного фактора X и фактора IX в плазме

человека. После добавления дополнительных СТР на С-конце наблюдалось трехкратное снижение активности сериновой протеазы (результаты не представлены).

Фармакокинетическое исследование.

Собранные rFVII, rFVII-СТР и rFVII-(СТР)<sub>2</sub> вводили внутривенно крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество) в дозе по 100 мкг/кг массы тела. Для всех экспериментов *in vivo* количество соответствующего белка определяли с помощью набора для ELISA FVII. Для каждого исследуемого вещества FVII инъектируемое количество рассчитывали, принимая во внимание различия в молекулярной массе между rFVII и rFVII-СТР, которые приводят к различным молярным концентрациям.

Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса, применяя измененную схему взятия образцов, чтобы минимизировать влияние процедуры взятия образцов на измеряемые уровни: поочередно из 3 крыс через 30 и 90 мин и через 2, 6 и 48 ч, и из трех оставшихся крыс через 15 и 60 мин и через 1,5, 4 и 24 ч. Плазму получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Осуществляли количественный анализ концентрации FVII с помощью анализа ELISA, специфичного для FVII. Период полужизни и площадь под фармакокинетической кривой (AUC) рассчитывали, применяя линейное правило трапеций. Сравнение данных параметров клиренса показало, что период полужизни *in vivo* и AUC для rFVII-(СТР)<sub>2</sub> были значительно выше, чем таковые для rFVII (табл. 30).

Таблица 30. Параметры ФК исследования

Группа	Путь	Доза	T <sub>1/2</sub>	AUC <sub>0-t</sub>	CL/F	MRT
		мкг/кг	мин	нг/мин/мл	мл/мин/кг	мин
FVII	в/в	60	4,07	3314,7	6,195	6,2
FVII-СТР	в/в	60	β=51,06	31353,9	0,287	73,7
FVII-СТР-СТР	в/в	60	β=13,66	7626,8	1,18	15,4

CL/F - отношение клиренса к степени всасывания (филтрации).

Определение характеристик рекомбинантного FVIIa-СТР.

В процессе активации, FVII расщепляется в положении R152, что приводит к получению доменов тяжелой и легкой цепи, которые связаны одной дисульфидной связью. rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> очищали и активировали с помощью процесса очистки на ионообменной колонке. Для того чтобы полностью оценить rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub>, данный белок загружали на гель для ЭФ в ПААГ/ДСН при восстановительных условиях, на который также загружали доступный для приобретения FVIIa (NovoSeven®). Домены тяжелой и легкой цепи разделялись и мигрировали в виде двух отдельных полос с молекулярными массами 55 и 25 кДа. Оба белка реагировали с антителами, специфичными к FVII, но тяжелая цепь rFVIIa-СТР специфично реагировала с антителами, специфичными к СТР, свидетельствуя о том, что данная полоса представляет собой тяжелую цепь FVII, слитую с СТР. Легкая цепь специфично реагировала с АТ к гамма-карбоксилазе. Концентрацию белка FVIIa определяли с помощью набора для ELISA, специфичного к FVIIa.

N-концевое секвенирование FVIIa.

Очищенные белки rFVII-СТР-СТР в активированной или зимогенной форме разделяли с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (на 12% трис-глициновом геле), а затем осуществляли электроблоттинг на мембрану PVDF. Интересующие полосы вырезали и помещали на очищенный обработанный биобренном (Biobrene) стекловолоконный фильтр. Анализ аминоконцевой последовательности осуществляли путем расщепления по Эдману, применяя импульсный жидкофазный белковый секвенатор, оборудованный микроградиентной системой ВЭЖХ 140 С. Идентичность рекомбинантного белка и правильное отщепление пропептида дополнительно проверяли с помощью аминоконцевого секвенирования.

Свертывающая активность FVIIa.

Чтобы оценить коагулирующую активность FVII-(СТР)<sub>2</sub>, осуществляли анализ активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). В образец плазмы, обедненной FVII, добавляли rFVIIa (NovoSeven®) или rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub>. 300 мкл плазмы человека, обедненной FVII, смешивали со 100 мкл FVIIa или rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> при определенных концентрациях, или с нормальной объединенной плазмой человека, и дополнительно разбавляли. После инкубации в течение 60 с при 37°C, в смесь добавляли тканевый фактор (TF), CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды. Определяли время свертывания крови в секундах. Эффективность оценивали путем сравнения кривой дозовой зависимости для rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> с таковой для эталонного препарата, состоящего из rhFVIIa или объединенной нормальной плазмы человека. За одну единицу FVIIa принимали такое количество FVIIa, активность которого была равна активности 1 мл нормальной плазмы человека. Свертывающую активность АЧТВ rFVII и rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> измеряли на коагулометре (Instrumentation Laboratory). Свертывающая активность АЧТВ rFVIIa и rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> была сходной.

Фармакокинетические исследования у крыс.

Для того чтобы охарактеризовать влияние добавления СТР к rFVIIa на увеличение его периода полужизни, проводили сравнительное фармакокинетическое исследование у крыс. NovoSeven® (rFVIIa) и

rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> в TBS вводили путем в/в инъекции 6 крысам SD. Уровни FVIIa в динамике детектировали с помощью набора для ELISA FVIIa. Период полужизни и AUC рассчитывали для каждого белка. Сравнение полученных параметров клиренса показало, что величины *in vivo* периода полужизни, выхода и AUC для rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> превосходили таковые для NovoSeven®.

Модель эффективности FVIIa-СТР *in vivo* (модель гемофилии у мышей, лишенных FVIII).

Для того чтобы оценить модель активности *in vivo*, получали мышей с нокаутированным геном FVIII, и создавали размножающуюся линию. 10 мкг либо доступного для приобретения рекомбинантного hFVIIa (NovoSeven®), либо rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> вводили путем инъекции в хвостовую вену анестезированной мыши (массой 22-28 г) с нокаутированным геном FVIII. Количество инъекцированного белка было равно необходимой концентрации FVIII в нормальной плазме (5 мкг/мл). Образцы крови отбирали из рассеченного хвоста в гепаринизированные капиллярные трубки в определенные моменты времени. Оценивали уровни FVIIa в образцах плазмы с помощью ELISA и измеряли эффективность с помощью анализа свертывания крови ЧТВ. В данном исследовании, получали слитую конструкцию FVII с СТР. Данный рекомбинантный белок представлял собой базовый компонент лечения, который обеспечивал увеличенный период полужизни и сохранение терапевтической эффективности.

Полученные результаты позволяют предположить, что rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> обладает терапевтической эффективностью, близкой к таковой для rFVIIa, у пациентов с гемофилией. Более того, данная технология требует менее частого введения. По-видимому, однократной инъекции rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> достаточно, чтобы контролировать эпизоды кровотечения и уменьшить количество инъекций, которые необходимы во время хирургического вмешательства. Данный рекомбинантный белок можно применять для длительного профилактического лечения.

Пример 5. Сравнительная оценка очищенных FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>.

5.1. Цель исследования.

Сравнительная оценка фармакокинетических параметров и свертывающей активности FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub>.

5.2. Получение собранных FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>.

КДНК FVII, слитого на С-конце с четырьмя или пятью последовательно присоединенными последовательностями СТР, экспрессировали в клетках Dg44, применяя систему экспрессии Excellgene, в присутствии 20 мкг/л витамина К3 (Sigma, Mennadion). Кондиционированные среды собирали (300 мл), фильтровали и замораживали.

5.3. Получение собранного FVII-СТР<sub>3</sub>.

FVII-СТР<sub>3</sub> экспрессировали внутри хозяина в системе экспрессии млекопитающего, в клетках CHO, применяя вектор rCI-DHFR. Стабильно трансфицированный пул №71 растили во встряхиваемых колбах в присутствии 25 нг/л витамина К3 (Sigma). Полученные суспензии клеток собирали и фильтровали.

Все собранные FVII-СТР (3, 4 и 5 СТР) концентрировали и диализовали против TBS (50 мМ трис, 150 мМ NaCl, pH 7,4), применяя кассету Pellicon XL с отсежкой по молекулярной массе 10 кДа.

5.4. Определение уровня антигена FVII.

Уровень антигена FVII определяли с применением набора для ELISA FVII человека (Zymotest Нурphen) (табл. 31). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам.

Таблица 31. Уровень антигена FVII

	FVII-СТР <sub>3</sub>	FVII-СТР <sub>4</sub>	FVII-СТР <sub>5</sub>
Ср. (нг/мл)	224357,3	87884,1	589423
СО	44789,5	3248,7	5309
% КВ	20,0	3,7	9

5.5. Иммуноблоттинг FVII-СТР.

Собранные FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель (expedon), на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли с помощью вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга), применяя поликлональные АТ к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica). FVII, слитый с тремя, четырьмя и пятью СТР, мигрировал на уровне 80, 90 и 100 кДа соответственно. Как и ожидалось, собранные FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>, полученные от Excellgene, обладали низким гамма-карбоксилированием по сравнению с собранным FVII-СТР<sub>3</sub>, который был получен от Prolog, поскольку процесс получения не был оптимизирован (фиг. 21).

5.6. Сравнительная оценка активности FVII *in vitro*.

Сравнительную оценку активности *in vitro* очищенных на ГА-колонке (сильно гамма-карбоксилированная фракция) FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Нурphen BioMed 221304). Готовили серийные разведения всех образцов и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарст-

венного средства, состоящего из нормальной плазмы человека. Для FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> продемонстрировали более низкую хромогенную активность, чем для объединенной нормальной плазмы (фиг. 22). Для FVII-СТР<sub>4</sub> продемонстрировали более высокую активность, как видно из отношений ЕС50, по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (табл. 32).

Таблица 32. Свертывающая активность FVII in vitro

Образец	ЕС50 (нг/мл)	Отношение ЕС50 образец /плазма
Плазма	0,05	
FVII 3СТР	0,12	2,72
FVII 4СТР	0,03	0,71
FVII 5СТР	0,06	1,35

#### 5.7. Свертывающая активность FVII in vitro.

Анализ активности фактора VII (FVII), который проводили в Медицинском центре им. Шибы, в Национальном центре свертывания крови Израиля, представлял собой анализ на основе протромбина (ПВ) с применением иммуносорбированной плазмы, обедненной фактором VII (Siemens). Реагент ПВ представлял собой инновин (innovin), и анализ осуществляли с помощью устройства CA 1500 Sysmex®. Нормальный диапазон FVII составлял 55-145%.

Таблица 33. Хромогенная активность FVII in vitro

Образец	% активности FVII	Концентрация в исследованном образце (мкг/мл)	Концентрация (мкг/мл)
FVII 3 СТР	36	0,5	224,2
	18	0,25	
	6	0,125	
FVII 4 СТР	334	0,5	87,9
	176	0,25	
	93	6,25	
FVII 5 СТР	38	0,5	58,9
	19	0,25	
	10	0,125	

Поскольку нормальный уровень циркулирующего в организме FVII составляет приблизительно 0,5 мкг/мл, выявили 3-кратное снижение коагулирующей активности собранных FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека; данный результат коррелирует с полученной хромогенной активностью (табл. 33).

Собранный FVII-СТР<sub>4</sub> проявил 3-кратное повышение потенциальной коагулирующей активности по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, что наблюдали в анализе хромогенной активности (табл. 33). Процент активности FVII-СТР<sub>4</sub> был гораздо выше, чем процент активности FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>. Методологические ограничения метода ELISA могут ограничить точность расчетов уровня АТ FVII-СТР<sub>4</sub>.

#### 5.8. Фармакокинетическое исследование.

Проводили два фармакокинетических исследования, чтобы определить фармакокинетические (ФК) параметры FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>. В процессе первого исследования, FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (группы А, В и С, соответственно) вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на группу лечения) в дозе 250 мкг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 и 96 ч после введения (табл. 34). Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

Таблица 34. Дизайн фармакокинетического исследования - концентрированный собранный продукт

Группа лечения	Исследуемый препарат	Количество животных/группу/ момент времени	Путь введения	Уровень дозы (мкг на животное)	Ињьцированный объем (мл)	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (часы после введения)
A	FVII-СТР*3	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
B	FVII-СТР*4	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FVII-СТР*5	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

Осуществляли количественный анализ концентрации FVII в образцах плазмы, применяя наборы для ELISA FVII человека (Zymutest FVII-Biophen). Рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени. Значения конечного периода полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. Ниже в табл. 35 кратко описаны рассчитанные концентрации FVII в различные моменты времени взятия образцов. ФК профиль (фиг. 23-24) и краткое описание ФК параметров (табл. 36) также представлены ниже. Для FVII-СТР<sub>5</sub> продемонстрировали лучший профиль по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>4</sub> (табл. 36).

Таблица 35. Первое фармакокинетическое исследование - концентрации FVII

Время (ч.)	Сред. FVII-3-СТР (нг/мл)	CO	Сред. FVII-4-СТР (нг/мл)	CO	Сред. FVII-5-СТР (нг/мл)	CO
0,083	4214	583	3600	427	4888	504
0,5	3386	892	5213	1682	5384	2549
2	1138	219	3603	1338	3082	289
5	1390	374	2726	1127	2480	561
8	333	167	1349	44	2316	633
24	133	12	476	98	788	34
48	38	3	165	24	384	61
72	12	2	91	62	167	31
96	26	1	42	8	93	49

Таблица 36. Фармакокинетический анализ

	FVII 3-СТР	FVII-4-СТР	FVII-5СТР
Период полужизни (0,083 - 8 ч.)	2,5	4,9	6,6
Период полужизни (8 - 72 ч.)	13,3	16,6	17,7
AUC (нг/ч/мл) (8 - 72 ч.)	18374,6	51224,4	72954,2
Vd (мл/кг) (8 - 72 ч.)	203,7	91,9	67,7
CL (мл/ч/кг) (8 - 72 ч.)	10,6	3,8	2,7

Добавление четырех или пяти СТР значительно продлевало период полужизни FVII по сравнению с добавлением 3 СТР в 2 и 3 раза, соответственно (табл. 36). Такое превосходство было наиболее важным в начальной части исследования (0,083-8 ч), позволяя предложить потенциально улучшенный выход белка и пониженный внесосудистый клиренс. AUC после введения FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> увеличилась в 3 и 4 раза, соответственно, по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub>. Клиренс также уменьшился при добавлении 4 и 5 СТР к FVII (табл. 36).

В данном исследовании наблюдали, что добавление четырех и пяти СТР значительно продлевало период полужизни FVII по сравнению с добавлением 3 СТР, причем как начальный, так и конечный период полужизни. Значения периода полужизни в первом и втором исследовании были различными вследствие различных аналитических подходов, и на них влияла доза и продолжительность исследования, тем не менее, общая тенденция сохранялась. AUC после введения FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> увеличи-

лась в 2,5 и 7 раз, соответственно, по сравнению с таковой для FVII-СТР<sub>3</sub>.

#### 5.9. Выводы.

В данном исследовании оценивали ФК параметры и потенциальную свертывающую активность FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>. Присоединение 4 и 5 СТР к FVII обеспечивало наибольший и улучшенный период полужизни, улучшенное воздействие и пониженный клиренс по сравнению с присоединением FVII-СТР<sub>3</sub>, при этом сохранялась сходная хромогенная активность и свертывающая активность *in vitro*. Данные результаты наблюдали при различных концентрациях белка, и они были сходными у собранного и очищенного белка. При оценке влияния присоединения СТР к С-концу FVII в целом, присоединение 1-5 СТР значительно увеличивало период полужизни и AUC FVII пропорционально присоединенным СТР, позволяя предложить, что по мере увеличения количества молекул СТР, период полужизни и стабильность FVII значительно улучшались, при этом сохранялась его исходная свертывающая активность *in vitro*, как показано ниже в настоящем тексте в табл. 37.

Таблица 37

<b>FVII по сравнению с FVII-СТР<sub>2</sub></b>	268	200
<b>FVII-СТР<sub>2</sub> по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub></b>	67	57,8
<b>FVII-СТР<sub>3</sub> по сравнению с FVII-СТР<sub>4</sub></b>	24	178
<b>FVII-СТР<sub>4</sub> по сравнению с FVII-СТР<sub>5</sub></b>	6	42

Ранее сообщали, что период полужизни FVII коррелировал с периодом полужизни активированной формы FVII (FVIIa) как у людей, так и у животных. Следовательно, ожидается, что будет достигнуто аналогичное улучшение периода полужизни для активированного варианта после присоединения СТР.

#### Пример 6.

Исследования пригодности FVII-СТР<sub>3</sub> для лишенных FVIII мышей с гемофилией.

Проводили исследования, описанные выше в настоящем тексте, в которых тестировали ФК профиль и коагулирующую активность собранных FVII-СТР, FVII-СТР<sub>2</sub> и FVII-СТР<sub>3</sub> по сравнению с таковыми у доступного для приобретения FVII. Для FVII-СТР<sub>3</sub> выявили улучшенный ФК профиль, при сохранении его коагулирующей активности, по сравнению с таковым для собранных FVII-СТР и FVII-СТР<sub>2</sub> или rhFVII. Для того, чтобы дополнительно охарактеризовать свойства FVII-СТР<sub>3</sub> *in vitro* и *in vivo*, получили небольшой стабильный пул клеток, экспрессирующих и секретирующих указанный белок, и разработали процессы очистки и активации.

В настоящем исследовании исследовали фармакокинетические и фармакодинамические свойства FVIIa-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FVIII. Оценивали ФК профиль белка. Определяли ФК профиль на основании удельной активности FVIIa и сравнивали с таковым у доступного для приобретения продукта NovoSeven®. Кроме того, исследовали *in vivo* длительную гемостатическую способность FVIIa-СТР<sub>3</sub> (способность вызывать свертывание крови) у мышей, лишенных FVIII, после рассечения хвостовой вены (исследование выживаемости).

#### Цели исследования.

Оценить фармакокинетические и фармакодинамические параметры FVIIa-СТР<sub>3</sub> по сравнению с таковыми у доступного для приобретения rhFVIIa (NovoSeven®) у мышей, лишенных FVIII, после однократного в/в введения сходной дозы активности.

Определить способность *in vivo* FVIIa-СТР<sub>3</sub> поддержания гомеостаза у мышей, лишенных FVIII, после однократного в/в введения FVIIa-СТР<sub>3</sub> и NovoSeven® в сходной дозе активности, после чего проводили испытание рассечением хвостовой вены (исследование выживаемости).

#### Получение собранного FVII-СТР<sub>3</sub>.

FVII-СТР<sub>3</sub> экспрессировали внутри хозяина в клетках Dg44, применяя вектор pCI-DHFR. Стабильный трансфицированный пул № 71 растили во встряхиваемых колбах, в присутствии 25 нг/л витамина K3 (Sigma). Суспензию клеток культивировали и собирали после снижения жизнеспособности до 60-80%. Собранные суспензии фильтровали и замораживали при -70°C.

#### Определение уровня антигена собранного FVII.

Уровень антигена FVII определяли с применением набора для ELISA FVII человека (Zymotest Нu-Phen) (табл. 38). Уровень антигена рассчитывали для каждой объединенной собранной партии.

Таблица 38. Уровень антигена FVII-СТР<sub>3</sub>

Уровень антигена FVII			
	Исследование ФК-ФД		Исследование выживаемости
	Собранная партия 31А	Собранная партия 31В	Собранная партия 38
Сред. (мкг/мл)	16,0	15,9	16,6
СО	1,5	0,0	0,8
% КВ	9,1	0,1	4,9

Процесс очистки FVII-СТР<sub>3</sub> (фиг. 25).

План процесса.

После короткого исследования очистки осуществляли следующий процесс очистки, применяя 2 колонки. С помощью аффинной колонки VII-Select (GE) и колонки с керамическим гидроксипатитом типа 1 (ГА), 40 мкм (Bio Rad), очищали обогащенный гамма-карбоксилированный белок FVII-СТР<sub>3</sub>. Самоактивацию вызывали путем инкубации очищенного FVII-СТР<sub>3</sub> в присутствии CaCl<sub>2</sub> в течение ночи при 2-8°C. Процесс очистки находился на конечной стадии разработки и его оптимизировали, поэтому часть этапов очистки не была идентичной для двух партий.

Ультрафильтрация/диафильтрация (УФ-ДФ) с применением кассеты из полого волокна или кассеты Pellicon с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа.

Осветленную собранную суспензию клеток размораживали при 4°C в течение выходных (2-3 дней).

Для партии 31 осветленную собранную суспензию клеток (12 л) концентрировали в 4 раза (двумя последовательными циклами), применяя картридж из полого волокна (GE Healthcare, номер в каталоге UFP-10-C-4X2MA) с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа. Концентрированную суспензию клеток подвергали диафильтрации против 1-2 объемов TBS (50 mM трис, 150 mM NaCl, pH 7,4).

Для партии 38 осветленную собранную суспензию клеток (8,5 л) концентрировали в 4 раза, применяя кассету Pellicon 2 (Millipore) с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа. Концентрированную суспензию клеток непосредственно загружали на колонку VII-Select.

Обе ультрафильтрации осуществляли на льду с ледяными буферами. Образцы УФ-ДФ фильтровали перед загрузкой через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Захват на колонке FVII-Select.

УФ-ДФ или концентрированную собранную суспензию клеток загружали на колонку VII-Select (ХК16/20, объем колонки 18 мл), заранее уравновешенную TBS, pH 7,4. Колонку промывали 50 mM трис-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5, и элюировали FVII-СТР<sub>3</sub> 50 mM трис-HCl, 1 M NaCl, 50% (в объемном отношении) пропиленгликоль, pH 7,5. Процесс осуществляли двумя последовательными циклами с применением одной и той же колонки.

Разделение на колонке с керамическим гидроксипатитом на основе гамма-карбоксилирования.

Элюированный продукт разбавляли 1:10 10 mM фосфатом натрия, pH 6,8, и загружали на колонку с керамическим гидроксипатитом (ХК16/20, объем колонки 24 мл). Колонку промывали 59 mM фосфата натрия, pH 6,8, и сильно гамма-карбоксилированную фракцию фактора VII элюировали 500 mM фосфатом натрия, pH 6,8. Данный процесс осуществляли двумя последовательными циклами на одной и той же колонке. Для каждой партии элюаты после двух циклов объединяли и концентрировали до 1,7-2 мг/мл и подвергали диафильтрации с 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,2, чтобы уменьшить объем и подготовить материал к этапу активации.

Активация FVII.

Очищенный FVII-СТР<sub>3</sub> разбавляли до 1 мг/мл и инкубировали с 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl и 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,2, при 2-8°C в течение 24 ч. Активацию завершали заменой буфера (УФ-ДФ) на предварительный рецептурный буфер (20 mM цитрат, 240 mM NaCl, 13,3 mM глицин, pH 6,9).

Аналитические свойства FVII-СТР<sub>3</sub> и FVIIa-СТР<sub>3</sub>.

ЭФ в ПААГ/ДСН и вестерн-блоттинг.

Очищенные FVII-СТР<sub>3</sub> и FVIIa-СТР<sub>3</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью окрашивания кумасси осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым голубым (5 или 10 мкг белка/дорожку). Осуществляли анализ методом вестерн-блот (1 мкг белка/дорожку), применяя поликлональные АТ к FVII человека (R&D Systems; AF2338), моноклональное антитело, узнающее гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499, 3570), и поликлональные АТ к СТР. При восстановительных условиях, FVII-СТР<sub>3</sub> мигрировал на уровне 75 кДа, а FVIIa-СТР<sub>3</sub> мигрировал в виде двух основных полос: тяжелой цепи на уровне 50 кДа и легкой цепи на уровне 25 кДа, представленных на фиг. 26 как полосы 2 и 3, соответственно.

Процедура очистки позволила значительно повысить содержание FVII-СТР<sub>3</sub> и уменьшить количество примесей. Выход процесса очистки составлял 25-30% FVII (согласно ELISA). Большая часть белка, потерянного в процессе очистки, обладала низкой хромогенной активностью FVII или не обладала активностью. На основании окрашивания кумасси геля после ЭФ в ПААГ/ДСН выявили, что восстано-

ленный FVIIa-CTP<sub>3</sub> мигрировал большим количеством полос, чем предсказывали. Полоса, которая мигрировала на уровне приблизительно ~75 кДа представляла собой неактивированный FVII (фиг. 26, полоса 1). Данная полоса состояла из двух полос с незначительными различиями в молекулярной массе, что может отражать различную степень гамма-карбоксилирования. Также наблюдали дополнительные полосы с молекулярной массой ниже 20 кДа. Ранее было описано, что они представляют собой продукты деградации тяжелой цепи.

Хромогенная активность FVII-CTP<sub>3</sub>.

Сравнительная оценка активности *in vitro* собранного FVII-CTP<sub>3</sub>, фракций в процессе очистки и очищенного FVII-CTP<sub>3</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen Bio-Med 221304). Готовили серийные разведения собранного FVII-CTP<sub>3</sub> и очищенного белка и оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости с таковой для эталонного препарата нормальной плазмы человека. После очистки FVII-CTP<sub>3</sub>, хромогенная активность значительно улучшалась, и неактивные фракции преимущественно отделяли на ГА-колонке (фиг. 27). Наблюдали сильную корреляцию между хромогенной активностью FVII и обнаружением FVII моноклональными антителами к Gla на вестерн-блоте. По значению EC50 видно, что хромогенная активность FVII в собранном материале была нарушена как в карбоксилированной, так и в некарбоксилированной фракции FVII. После очистки и обогащения гамма-карбоксилированной фракцией FVII-CTP<sub>3</sub>, активность улучшалась, демонстрируя существенный вклад гамма-карбоксилирования в активность FVII (фиг. 27). Данный параметр важен для адекватной активности FVII *in vivo* и будет дополнительно проработан в программе разработки клонов.

Определение количества белка на длине волны A280.

Теоретический коэффициент поглощения FVIIa-CTP<sub>3</sub> и NovoSeven® рассчитывали, применяя алгоритм ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Расчет был основан на последовательности аминокислот. Рассчитанные коэффициенты поглощения для FVII-CTP<sub>3</sub> и NovoSeven® составляли 1,186 и 1,406, соответственно. Данные значения представляют собой поглощение 1 г/л при 280 нм.

Различие в коэффициенте поглощения между двумя белками возникло исключительно благодаря увеличению молекулярной массы FVIIa-CTP<sub>3</sub> по сравнению с NovoSeven®, поскольку в CTP отсутствуют ароматические и остатки цистеина, следовательно, он не вносит вклад в поглощение.

Определение количества белка на A280 использовали для конечного FVII и для очищенных образцов в процессе очистки, начиная с элюирования с колонки VII-Select.

Определение уровня антигена FVIIa.

Уровень антигена FVIIa определяли с применением набора для ELISA FVIIa человека (IMUBIND, American Diagnostica). Уровень антигена рассчитывали для каждой партии. Тем не менее, данный способ не был полезен для определения дозы для инъекции, поскольку он не отражал количество активного продукта.

Анализ свертывания крови FVIIa-Staclot® VIIa-rTF.

FVIIa получали путем расщепления внутри цепи одноцепочечного FVII. Нативный тканевый фактор (TF) представляет собой кофактор FVIIa. При связывании с TF, FVII опосредует активацию фактора X в Xa, при этом сам превращается в FVIIa. Растворимый тканевый фактор представляет собой внеклеточную часть нативного тканевого фактора. Он больше не может активировать FVII путем самоактивации, но FVIIa, связанный с тканевым фактором, может активировать FX в FXa.

Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF), применяемый в данном анализе, специфичен к FVIIa, что используют для создания анализа свертывания крови FVIIa. RsTF в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов приводит к свертыванию плазмы без активации FVII в FVIIa.

Наблюдаемое время свертывания крови в данной системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в исследуемом образце, и не зависит от присутствия FVII в образце.

Анализ проводили в Omri Laboratories (Нес-Циона, Израиль). Активность FVIIa оценивали как у NovoSeven® после восстановления влагосодержания, так и у FVIIa-CTP<sub>3</sub> перед каждым исследованием. Активность NovoSeven® не коррелировала с предполагаемой активностью, указанной на флаконе, но такое несоответствие могло возникнуть вследствие различных подходов к оценке активности. В табл. 39 кратко описана свертывающая активность FVIIa на объем без учета концентрации белка.

Таблица 39. Свертывающая активность FVIIa в продуктах партий

	ФК исследование		Исследование выживаемости	
	FVIIa-3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven®	FVIIa-3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven®
Активность (Ед./мл)	1,3*10 <sup>6</sup>	2,5*10 <sup>5</sup>	1,3*10 <sup>6</sup>	7,4*10 <sup>5</sup>

Удельная активность FVIIa-CTP<sub>3</sub>.

Удельную активность (УА) FVIIa (которую рассчитывали как активность/мл, деленную на концентрацию белка) рассчитывали на основании A280 и представили в табл. 40. При сравнении удельных ак-

тивностей двух указанных молекул, которые отличаются по молекулярной массе, нужно внести корректировку для того, чтобы нормировать активность (т.е. вследствие различия в молекулярной массе, количество активных сайтов в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раз больше, чем в 1 мг FVIIa-СТP<sub>3</sub>). Расчет переводного коэффициента представлен в следующем уравнении:

$$\text{Нормированная\_YA} = (\text{YA}(\text{FVIIa-СТP}_3) / \text{мол. массу}(\text{FVII-СТP}_3)) \times \text{мол. массу}(\text{нативного FVII}) = (\text{YA}(\text{FVIIa-СТP}_3) / 53419,5 \text{ Да}) \times 45079,1 \text{ Да} = (\text{YA}(\text{FVIIa-СТP}_3) \times 1,185)$$

Таблица 40. Удельная активность FVIIa-СТP<sub>3</sub> по сравнению с NovoSeven®

Образец	Сред. A280	СО (n=9)	% КВ	Коэффициент поглощения	Конц. белка (мг/мл)	Ед./мл	Удельная активность		Кратность снижения относительного NovoSeven®
							Ед./мг белка	Ед./мг FVIIa	
NovoSeven®	1,274	0,031	2,398	1,406	0,906	8,36*10 <sup>5</sup>	9,23*10 <sup>5</sup>	9,23*10 <sup>5</sup>	1,0
FVIIa-СТP <sub>3</sub>	4,396	0,092	2,094	1,186	3,706	7,23*10 <sup>5</sup>	1,95*10 <sup>5</sup>	2,31*10 <sup>5</sup>	4,0

Исследование ФК-ФД FVIIa-СТP<sub>3</sub>.

План исследования.

FVIIa-СТP<sub>3</sub> и rhFVIIa (NovoSeven®, NS) вводили однократной внутривенной инъекцией мышам C57B, лишенным FVIII, в дозе 6,4\*10<sup>6</sup> ед./кг массы тела (160000 ед./животное). Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 4 мышей поочередно через 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 и 72 ч после введения (табл. 41). Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa и проводили тщательный ФК анализ. Исследование осуществляли в Omri Laboratories (Нес-Циона, Израиль).

Таблица 41. Схема исследования

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество животных / группу / момент времени	Путь введения	Количество единиц / животное	Инъецируемый объем (мкл)	Моменты времени (часы после введения)
A	rhFVIIa	4	в/в	1,6*10 <sup>5</sup>	200	0 (до введения), 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa-СТP <sub>3</sub>	4	в/в	1,6*10 <sup>5</sup>	200	0 (до введения), 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

ФК профиль FVIIa-СТP<sub>3</sub> у мышей, лишенных FVIII.

Осуществляли количественный анализ активности FVIIa в образцах крови, применяя набор Staclo® VIIa-rTF (Stago, Парсиппани, Нью-Джерси). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль и он представлял собой среднее значение по 4 животным в каждый момент времени. На фиг. 28 представлен ФК профиль FVIIa в процессе эксперимента. Выход FVIIa представлен в табл. 42. Краткое описание ФК параметров представлено в табл. 43.

В табл. 41 кратко описаны значения свертывающей активности после введения либо NovoSeven®, либо FVIIa-СТP<sub>3</sub>. FVIIa-СТP<sub>3</sub> и NovoSeven® достигали максимальной активности через полчаса после введения. Наивысшее значение активности NovoSeven® достигло лишь 43% максимального значения активности FVIIa-СТP<sub>3</sub>. Свертывающая активность FVIIa-СТP<sub>3</sub> сохранялась в течение более продолжительного периода времени, демонстрируя продленную активность. Свертывающая активность у мышей, которых лечили NovoSeven®, не детектировалась в моменты времени после 12 ч, тогда как у мышей, которых лечили FVIIa-СТP<sub>3</sub>, измеримая активность продолжала сохраняться в течение 48 ч после введения (табл. 41 и фиг. 28). Добавление трех последовательно присоединенных копий СТP к FVIIa повышало выход на 100% (табл. 42), что измеряли по наибольшей активности после введения и сравнивали с предполагаемой активностью на основании анализа in vitro, и увеличивало период полужизни и среднее время удерживания (MRT) в 5 раз. Время воздействия (AUC) повышалось в 3 раза (табл. 43).

Таблица 41. Свертывающая активность FVIIa после однократной в/в инъекции

Время после введения (часы)	Средняя свертывающая активность FVIIa (ед./мл)	
	FVIIa-CTP <sub>3</sub>	NovoSeven®
0,16	6,8*10 <sup>7</sup>	3,2*10 <sup>7</sup>
0,5	9,7*10 <sup>7</sup>	4,3*10 <sup>7</sup>
2	2,1*10 <sup>7</sup>	3,9*10 <sup>6</sup>
4	7,7*10 <sup>6</sup>	7,3*10 <sup>5</sup>
8	2,7*10 <sup>6</sup>	4,2*10 <sup>4</sup>
12	3,7*10 <sup>5</sup>	6,2*10 <sup>3</sup>
24	2,4*10 <sup>4</sup>	НПКО
34	4,6*10 <sup>3</sup>	НПКО
48	1,5*10 <sup>3</sup>	НПКО

Таблица 42. Выход FVIIa-CTP<sub>3</sub>

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество единиц/животное	Фактически вводимая доза (ед./мл)	*Предполагаемая C <sub>max</sub> (ед./мл крови)	C <sub>max</sub> (ед./мл)	% выхода
A	rFVIIa	1,60*10 <sup>5</sup>	1,20*10 <sup>6</sup>	1,40*10 <sup>5</sup>	4,25*10 <sup>4</sup>	30
B	FVIIa-CTP <sub>3</sub>	1,60*10 <sup>5</sup>	1,29*10 <sup>6</sup>	1,50*10 <sup>5</sup>	9,74*10 <sup>4</sup>	64,6

\*Предполагаемая C<sub>max</sub> представляет собой вводимую дозу, деленную на объем крови.

Таблица 43. ФК параметры FVIIa-CTP<sub>3</sub> по сравнению с NovoSeven®

ФК параметры	NovoSeven®	FVIIa-CTP <sub>3</sub>
Период полужизни-α (0,5 - 12 ч.)	0,94	1,57
Период полужизни-β (12 - 48 ч.)	НД	4,62
AUC (мЕд.*ч/мл)	5,80*10 <sup>7</sup>	1,80*10 <sup>8</sup>
Vd/kg (мл/кг)	1408	2375
CL/kg (мл/ч/кг)	1034	356
MRT (ч.)	1,3	6,7

Анализ образования тромбина (TGA).

Образование тромбина является основной частью каскада свертывания крови, и по существу оценка того, насколько хорошо конкретный индивид может образовывать тромбин, может коррелировать с риском кровотечения или тромбоза. Переменные, которые обычно измеряют при анализе образования тромбина, включают: время задержки, время до пика образования тромбина, пик, эндогенный потенциал тромбина (ETP) (т.е. площадь под фармакокинетической кривой и хвостом), динамика тромбограммы ("TG"). После времени задержки наблюдался выброс тромбина. Тем не менее, свертывание крови происходит по окончании времени задержки, когда более чем 95% всего тромбина еще не образовалось. Анализ образования тромбина проводили в Omri Laboratories, применяя реагенты Thrombinoscope, дополненные гемофильной плазмой человека. TGA отражает способность свертывания плазмы мышей, вызванную инъекцией NovoSeven® и FVIIa-CTP<sub>3</sub>. На фиг. 29 представлены значения параметров TGA для плазмы мышей после введения FVIIa-CTP<sub>3</sub> или NovoSeven®. После введения FVIIa-CTP<sub>3</sub>, все три параметра (скорость образования тромбина, максимальное количество образованного тромбина и КПа) демонстрируют преимущество лечения FVII-CTP<sub>3</sub> над лечением NovoSeven®. Это дополнительно подкрепляет наличие преимущества потенциального пролонгированного действия FVII-CTP<sub>3</sub> над NovoSeven®.

Исследование лечения FVIIa-CTP<sub>3</sub> после рассечения хвостовой вены (PXB).

План исследования.

Результаты, полученные при исследовании ФК/ФД FVIIa-CTP<sub>3</sub>, дали представление о функциональных свойствах FVIIa-CTP<sub>3</sub> и продемонстрировали, что FVIIa-CTP<sub>3</sub> обладает фармакокинетическим преимуществом над NovoSeven®. Тем не менее, способность белка вызывать свертывание крови in vivo после травматического случая еще не была продемонстрирована. Чтобы оценить способность FVIIa-CTP<sub>3</sub> останавливать кровотечение, использовали ту же модель мышей, лишенных FVIII, для теста с кровотечением.

Мышам, лишенным FVIII, вводили однократную внутривенную инъекцию FVIIa-CTP<sub>3</sub> или NovoSeven®. Мышам вводили дозу лекарственного средства в количествах, которые обеспечивали эквивалентную FVIIa активность (1,6\*10<sup>5</sup> единиц, 200 мкл), рассчитанную в соответствии с эффективностью каждого лекарственного средства, оцененной в анализе свертывающей активности FVIIa (табл. 44). Вво-

димые дозы составляли 9 мг/кг NovoSeven® и 40 мг/кг FVIIa-СТP<sub>3</sub> вследствие пониженной активности FVIIa-СТP<sub>3</sub>. Контрольной группе вводили путем инъекции 200 мкл среды. Хвостовую вену рассекали на расстоянии 2,7 см от кончика хвоста через 15 мин (инъекция 1), 24 ч (инъекция 2) или 48 ч (инъекция 3) после введения, и выживаемость мышей регистрировали в течение 24 ч.

Таблица 44. Оценка введенных путем инъекции образцов

№ инъекции	NovoSeven®			FVIIa-СТP <sub>3</sub>			
	Конц. белка (мг/мл)	Активность (ед./мл)	Удельная активность (ед./мг)	Конц. белка (мг/мл)	Активность (ед./мл)	Удельная активность (ед./мг)	Удельная активность (нормированная)
1	0,91	8,0*10 <sup>5</sup>	8,8*10 <sup>5</sup>	3,63	6,6*10 <sup>5</sup>	1,8*10 <sup>5</sup>	2,2*10 <sup>5</sup>
2	0,92	8,3*10 <sup>5</sup>	9,0*10 <sup>5</sup>	3,81	7,8*10 <sup>5</sup>	2,0*10 <sup>5</sup>	2,4*10 <sup>5</sup>
3	0,89	8,8*10 <sup>5</sup>	9,9*10 <sup>5</sup>	3,68	7,3*10 <sup>5</sup>	2,0*10 <sup>5</sup>	2,3*10 <sup>5</sup>

Концентрацию белка определяли по A280.

Результаты.

Результаты для контрольных групп, которым вводили среду путем трех инъекций (5 животных x 3 инъекции), кратко описали и представили на фиг. 30. Наблюдали выживаемость 30% через 24 ч после рассечения хвостовой вены.

У мышей, которых лечили NovoSeven® и FVIIa-СТP<sub>3</sub>, продемонстрировали адекватную гемостатическую активность после рассечения хвостовой вены, которое осуществляли через 15 мин после введения FVIIa. У животных, которых лечили FVIIa-СТP<sub>3</sub> и NovoSeven®, наблюдали коэффициент выживаемости 100% (фиг. 30).

Пониженная скорость выведения FVII-СТP<sub>3</sub>, которую продемонстрировали в исследовании ФК/ФД, была наиболее явно видна, когда рассечение хвостовой вены осуществляли через 24 ч после введения. Наблюдалось уменьшение коэффициента выживаемости для NovoSeven®. Аналогично контрольной группе, 50% смертей наблюдалось в течение 10 ч. Тем временем 90% мышей, которых лечили FVIIa-СТP<sub>3</sub>, выжило (фиг. 30). Полученные результаты подчеркивают длительную эффективность лечения FVIIa-СТP<sub>3</sub>.

Через 48 ч после введения продемонстрировали уменьшение коэффициента выживаемости в группах, которых лечили любым из FVIIa-СТP<sub>3</sub> и NovoSeven® (фиг. 30С). Наблюдали небольшое улучшение у мышей, которых лечили FVIIa-СТP, но различие не достигло статистической значимости.

Обсуждение.

Слияние СТР с рекомбинантными белками продлевает период полужизни белков из кровообращения, при этом сохраняется их сопоставимая активность. Хотя механизм, обуславливающий пониженный клиренс белка больше порогового размера 70 кДа, хорошо изучен по сравнению с почечным клиренсом, дополнительной защиты добиваются после присоединения СТР. Полагают, что присоединение СТР разворачивает белковый щит и защищает его от протеолитического расщепления, увеличивает его радиальную молекулярную массу благодаря сильно отрицательному заряду и уменьшает его аффинность к рецепторам клиренса печени.

Целью настоящего исследования было дать определенное представление о влиянии слияния СТР с FVII на период полужизни и клиренс белка, а также исследовать его удельную активность после данной модификации. Мышам, лишенным FVIII, вводили однократную в/в инъекцию FVIIa-СТP<sub>3</sub> или доступно для приобретения рекомбинантного FVIIa (NovoSeven®) в сходных дозах (в единицах), и осуществляли ФК анализ на основании активности. Для FVIIa-СТP<sub>3</sub> продемонстрировали большее время полужизни, как видно по 5- и 3,5-кратному увеличению периода полужизни и AUC, соответственно. Было показано, что удельная активность (ед./мг) FVIIa-СТP, рассчитанная по активности, определенной с помощью набора Staclot®, деленной на концентрацию белка, измеренную на A280, была в 4-5 раз ниже, чем удельная активность NovoSeven®. Чтобы закрепить понимание того, как СТР влияет на кровоостанавливающее действие FVIIa in vivo, исследовали способность FVIIa-СТP<sub>3</sub> уменьшать кровотечение. В модели кровотечения с рассечением хвостовой вены, в модели мышей с гемофилией, введение rFVIIa могло улучшить коэффициент выживаемости подвергнутых рассечению животных и избежать у них смертельного кровотечения. В исследовании, описанном в настоящем тексте, животным вводили FVIIa-СТP<sub>3</sub> или NovoSeven®. Обе молекулы были способны поддерживать гомеостаз, если рассечение осуществляли через 0,25 ч после введения. Значительно дольше продолжительность активности продемонстрировали для группы лечения FVIIa-СТP<sub>3</sub>, когда рассечение хвоста осуществляли через 24 ч после введения. Коэффициент выживаемости в группе лечения средой был выше, чем предполагаемый, и выше, чем полученный в предыдущих исследованиях (50% по сравнению с 20% в предыдущих исследованиях, результаты не

представлены). Процент выживаемости подвергнутых лечению животных дополнительно оценивали в более ранние моменты времени, например через 36 ч после введения.

В заключение, продемонстрировали, что FVIIa-СТP<sub>3</sub> обладает большей продолжительностью активности у мышей с гемофилией, которая приводит к большей продолжительности кровоостанавливающего действия по сравнению с NovoSeven®. Полученные результаты позволяют предположить, что сливание СТP с FVII представляет собой технологию, которая потенциально может значительно улучшить профилактическое лечение пациентов с гемофилией.

Пример 7. Сравнительная оценка профиля очищенного FVII-СТP<sub>3</sub> по сравнению с таковым для FVII-СТP<sub>5</sub> после однократной в/в или п/к инъекции крысам SD.

Цель исследования.

Проводили два исследования.

Целью первого исследования было определить фармакокинетические параметры rFVII-СТP<sub>3</sub> по сравнению с rFVII-СТP<sub>5</sub> после очистки на колонке FVII-Select (FVII-S) и ГА-колонке у самцов крыс линии Sprague-Dawle, после однократного внутривенного введения 50 мкг/животное.

Во втором исследовании изучали фармакокинетические параметры rFVII-СТP<sub>3</sub>-ГА по сравнению с rFVII-СТP<sub>5</sub>-ГА у самцов крыс линии Sprague-Dawle после однократного внутривенного или подкожного введения 100 мкг/животное.

Результаты.

Определение уровня антигена FVII-СТP 3 и FVII-СТP 5.

Уровень антигена FVII определяли с применением набора для ELISA FVII человека (Zymotest Ну-Phen) (см. табл. 45).

Таблица 45. Кратко описана рассчитанная концентрация белка, которая представляет собой среднее значение по трем независимым экспериментам

	FVII 3 СТP		FVII 5 СТP	
	<u>FVII-S 46</u> эл. конц. диал.	<u>FVII-ГА 46 эл.</u> конц. диал.	<u>FVII-S эл.</u> конц. диал.	<u>FVII-ГА 5 100% В</u> конц. диал.
Сред. (нг/мл)	3,78*10 <sup>6</sup>	1,59*10 <sup>6</sup>	1,88*10 <sup>6</sup>	7,92*10 <sup>5</sup>
СО	1,30*10 <sup>6</sup>	6,03*10 <sup>5</sup>	7,15*10 <sup>5</sup>	3,57*10 <sup>5</sup>
КВ (%)	3,43*10 <sup>1</sup>	3,80*10 <sup>1</sup>	3,80*10 <sup>1</sup>	4,51*10 <sup>1</sup>

Анализ методом вестерн-блот исследованных образцов.

Образцы FVII-СТP<sub>3,5</sub> загружали на 4-12% бис-трис гель (NuPage, invitrogene), на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли с помощью вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга), применяя поликлональные АТ к FVII (R&D Systems), поликлональные АТ к СТP (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica). Вкратце, FVII, слитый с тремя и пятью СТP, мигрировал на уровне 80 и 100 кДа, соответственно (см. фиг. 31).

Сравнительная оценка активности FVII in vitro.

Анализ активности FVII, который проводили в Медицинском центре им. Шибы, в Национальном центре свертывания крови, представлял собой анализ на основе ПВ с применением иммуноадсорбированной плазмы, обедненной фактором VII (Siemens). Реагент ПВ представлял собой инновин (innovin), и анализ осуществляли с помощью устройства CA 1500 Sysmex. Нормальный диапазон FVII составлял 55 - 145%. Активности образцов кратко описаны в табл. 46.

Таблица 46. Активность образцов

Образец	Концентрация (мг/мл) согласно NANODROP	Концентрация в исследованном образце (мкг/мл)	Результаты (%)	Средняя активность - % от активности плазмы
FVII-5СТP FVII-S эл. конц. диал.	2,19	2	87	16%
		1	30	
		0,5	10	
FVII-5СТP-ГА 5 100% В конц. диал.	1	2	97	21%
		1	36	
		0,5	13	
FVII-S 46 эл. конц. диал.	3,17	2	100	18%
		1	35	
		0,5	12	
FVII-ГА 46 эл. конц. диал. (1)	1,5	2	92	20%
		1	33	
		0,5	10	

Нормальный уровень циркулирующего в организме FVII составляет приблизительно 0,5 мкг/мл.

Оба FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> проявили приблизительно 5-кратное снижение коагулирующей активности по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека.

Фармакокинетическое исследование.

Проводили два фармакокинетических исследования, чтобы определить фармакокинетический (ФК) профиль и параметры FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (после очистки на колонке FVII-Select и колонке FVII-ГА). В первом исследовании, FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> после очистки на колонке FVII-Select/ГА вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество) в дозе 50 мкг/крысу.

Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после введения. Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

Во втором исследовании изучали только образцы после ГА-колонки. Данные образцы вводили однократной внутривенной или подкожной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество), применяя дозу 100 мкг/крысу. Образцы крови собирали в те же моменты времени и при тех же условиях, что и в первом исследовании, описанном выше.

Таблица 47. Дизайн первого исследования (FVII-Select по сравнению с FVII-ГА)

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество животных/ группу	Путь введения	Уровень дозы (мкг на животное)	Инъецированный объем (мкл)	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (часы после введения)
A	FVII-СТР*3, партия 46, ГА	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-СТР*3 партия 46, FVII-S	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-СТР*5, партия 5, ГА	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-СТР*5, партия 5, FVII-S	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

Таблица 48. Дизайн второго исследования (внутривенное введение по сравнению с подкожным)

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество животных / группу/	Путь введения	Уровень дозы (мкг на животное)	Инъецированный объем (мл)	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (часы после введения)
A	FVII-СТР*3, партия 46, ГА	6	в/в	100	200	500	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-СТР*3, партия 46, ГА	6	п/к	100	200	500	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-СТР*5, партия 5, ГА	6	в/в	100	200	500	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-СТР*5, партия 5, ГА	6	п/к	100	200	500	0 (до введения) 0,083 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

Основные различия между данными двумя исследованиями представляли дозировки и путь введения. В первом исследовании крысам вводили путем в/в инъекции дозу 50 мкг/крысу, тогда как во втором исследовании крысам вводили путем в/в или п/к инъекции дозу 100 мкг/крысу (всего 500 мкг/кг; масса крыс 200 г). Повышение дозировки произошло вследствие изменения типа введения; п/к введение требует больших количеств для достижения эффекта, близкого к эффекту в/в введения.

Анализ ФК исследования.

Осуществляли количественный анализ концентрации FVII в образцах плазмы, применяя наборы для ELISA FVII человека (zymutest FVII-Biophen). Рассчитывали фармакокинетические профили, и они отражали среднее значение по 3 животным в каждый момент времени. Конечные значения периода полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В табл. ниже кратко описаны рассчитанные концентрации FVII в различные моменты времени взятия образцов. ФК профиль и краткое описание ФК параметров представлены в таблице ниже.

Таблица 49. Первое фармакокинетическое исследование (FVII-Select по сравнению с FVII-ГА) - концентрации FVII (нг/мл)

Время (часы)	FVII СТР*3, партия 46, ГА	FVII СТР*3, партия 46, FVII-S	FVII СТР*5, партия 5, ГА	FVII СТР*5, партия 5, FVII-S
0,083	1816,3	1633,9	2064,3	1853,5
0,5	1523,7	1409,9	1351,4	1418,0
2	1284,9	1041,7	1389,7	834,4
5	607,9	531,6	722,7	737,2
8	524,2	430,0	712,2	614,6
24	115,5	132,9	272,5	201,8
48	21,1	31,6	62,3	90,4
72	9,5	15,8	29,1	31,8
96	НПКО	5,8	7,0	16,9
120	НПКО	НПКО	8,5	13,4

Таблица 50. Второе фармакокинетическое исследование (внутривенное введение по сравнению с подкожным) - концентрации FVII (нг/мл)

Время (часы)	FVII СТР*3, партия 46, ГА-в/в	FVII СТР*5, партия 5, ГА-в/в	FVII СТР*3, партия 46, ГА-п/к	FVII СТР*5, партия 5, ГА-п/к
0,083	6452,6	6153,3	5,0	НПКО
0,5	3930,7	3660,6	14,5	14,6
2	1992,3	2176,2	113,6	96,2
5	1598,9	2087,3	106,6	70,5
8	781,6	1075,6	188,9	129,7
24	268,5	627,2	155,0	239,2
48	51,9	143,3	43,0	88,6
72	8,8	39,0	7,0	36,7
96	НПКО	10,8	НПКО	10,4
120	НПКО	8,2	НПКО	8,7

Таблица 51. ФК анализ - первое фармакокинетическое исследование (FVII-S по сравнению с ГА)

	FVII СТР*3, партия 46, ГА	FVII СТР*3, партия 46, FVII-S	FVII СТР*5, партия 5, ГА	FVII СТР*5, партия 5, FVII-S
Период полужизни (0,083 - 8 ч.)	4,3	4,0	5,51	5,59
Период полужизни (8 - 72/96/120 ч.)	11,1	12,1	16,46	20,29
Период полужизни (8 - 72) (ч.)	11,1	13,4	13,62	15,64
AUC(0-t) (набл. площадь) (8 - 72/96/120 ч.)	14566,9	13686,4	21812,7	19307,9
Площадь AUC ( $\infty$ ) (8 - 72/96/120 ч.)	14718,2	13788,1	22013,9	19701
Vd (площадь)/кг (мл/кг)(8 - 2/96/120 ч.)	271,1	316,1	269,7	371,5
CL (площадь)/кг(мл/ч/кг) (8 - 72/96/120 ч.)	17,0	18,1	11,356	12,69

Добавление пяти СТР продлевало период полужизни FVII по сравнению с 3 СТР. Обе формы с 5 СТР (т.е. FVII-S и FVII-ГА) были обнаружены в далекие моменты времени (96 и 120 ч), тогда как FVII-3 СТР-ГА и FVII-3 СТР-S были обнаружены до 72 ч и 96 ч, соответственно. На основании данного факта, период полужизни FVII-5 СТР оказался большим, чем таковой у вариантов 3СТР (см. фиг. 32). Сравнение периодов полужизни всех исследованных материалов (3 и 5 СТР) в одни и те же моменты времени (8-72 ч) показало, что периоды полужизни были сходными, хотя 5 СТР гораздо длиннее (фиг. 32).

Таблица 52. ФК анализ - второе фармакокинетическое исследование (внутривенное введение по сравнению с подкожным)

	FVII СТР*3, партия 46, ГА- в/в	FVII СТР*5, партия 5, ГА- в/в	FVII СТР*3, партия 46, ГА- п/к	FVII СТР*5, партия 5, ГА- п/к	Биожизнес пособность СТР*3	Биожизнес пособность СТР*5
Период полужизни (0,083 - 8 ч.)	3,0	3,9	-1,8	-3,18		
Период полужизни (8 - 72\96\120 ч.)	9,9	14,6	13,14	22,94		
Период полужизни (8 - 72) (ч.)	9,9	13,0	13,14	29,47		
AUC(0-t) (набл. площадь) (8 - 72/96/120 ч.)	28866,8	43761,0	6600	9822,7	22,9	22,4
AUC ( $\infty$ ) площадь (8 - 72/96/120 ч.)	28993,0	43934,4	6733	10110,8	23,22	23,01
Vd (площадь)/кг (мл/кг) (8 - 72/96/120 ч.)	246,4	240,5	1407,6	1636,8		
CL (площадь)/кг (мл/ч/кг) (8 - 72/96/120 ч.)	17,2	11,4	74,261	49,452		

Вновь, как наблюдали в первом исследовании, добавление 5 СТР продлевало период полужизни FVII по сравнению с добавлением 3 СТР, причем как начальный, так и конечный период полужизни и при обоих путях введения (в/в и п/к, см. фиг. 33). Как и ожидалось, после п/к введения FVII впервые обнаруживали в крови в более поздний момент времени по сравнению с в/в введением.

Выше были кратко описаны два ФК исследования. Основной целью первого исследования была проверка различия между FVII-3СТР и FVII-5СТР после очистки на 2 различных колонках: FVII-Select и FVII-ГА. В наших предыдущих исследованиях мы сравнивали собранные белки с очищенными белками и обнаружили, что различие между вариантами FVII с 3 и 5 СТР было больше, когда крысам вводили путем инъекции собранные белки.

Не наблюдали значимого различия между результатами FVII 3/5 СТР после очистки на обоих колонках, следовательно решили во втором исследовании инъектировать FVII 3/5 СТР-ГА.

Пример 8. Исследование выживаемости мышей, лишенных FVIII, после подкожной инъекции FVIIA-СТР<sub>3</sub> (MOD-5014).

Цель исследования.

Оценить эффективность NovoSeven®, MOD-5014 (FVIIA-СТР<sub>3</sub>) и MOD-5019 (FVIIA-СТР<sub>5</sub>) в исследовании рассечения хвостовой вены, после подкожного введения.

Аналитические свойства FVIIA-СТР<sub>3</sub> (MOD-5014) и FVIIA-СТР<sub>5</sub> (MOD 5019).

Определение количества белка на A280.

Теоретический коэффициент поглощения NovoSeven® рассчитывали, применяя алгоритм ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Расчет был основан на последовательности аминокислот. Рассчитанный коэффициент поглощения для NovoSeven® составлял 1,406, а для MOD-5019 составлял 1,075 (значения представляют поглощение 1 г/л на 280 нм). Коэффициент поглощения MOD-5014 определяли с помощью анализа аминокислот Mscan. Коэффициент поглощения для MOD-5014 составлял 1,27.

Анализ свертывания крови FVIIa - STACLOT VIIa-rTF.

FVIIa получают путем расщепления внутри цепи одноцепочечного FVII. Нативный тканевый фактор (TF) представляет собой кофактор FVIIa, при связывании с TF, FVII опосредует активацию фактора X в FXa, при этом сам превращается в FVIIa. Растворимый тканевый фактор представляет собой внеклеточную часть нативного тканевого фактора. Он больше не может активировать FVII путем самоактивации, но FVIIa, связанный с тканевым фактором, может активировать FX в FXa.

Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF), используемый в данном анализе, специфич-

чен к FVIIa, что используют для создания теста свертывания крови FVIIa. Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF) в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов, вызывает свертывание плазмы без активации FVII в FVIIa. Наблюдаемое время свертывания крови в данной системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в исследуемом образце, и не зависит от присутствия FVII в образце.

Активность FVIIa оценивали для NovoSeven® с восстановленным влагосодержанием и для MOD-5014 и MOD-5019 перед каждым исследованием.

Удельную активность FVIIa (которую рассчитывали как активность/мл, деленную на концентрацию белка) рассчитывали на основании A280 и представили в табл. 53. При сравнении удельной активности указанных двух молекул, которые отличаются по молекулярной массе, нужно внести корректировку для того, чтобы нормировать активность (т.е. вследствие различия в молекулярной массе, количество активных сайтов в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раз больше, чем в MOD-5014, и в 1,307 раз больше, чем в MOD-5019). Следовательно, расчет переводного коэффициента представлен в следующем уравнении:

$$\text{Нормированная\_YA} = (\text{YA}(\text{FVIIa-CTP}_3) / \text{мол. массу нативного FVII}) \times \text{мол. массу (FVII-CTP}_3) = (\text{YA}(\text{FVIIa-CTP}_3) / 45079,1 \text{ Да}) \times 53419,5 \text{ Да} = (\text{YA}(\text{FVIIa-CTP}_3) \times 1,185$$

Таблица 53. Удельная активность MOD-5014 по сравнению с NovoSeven®

Образец	Конц. белка на A280 (мг/мл)	Удельная активность (ед./мг FVIIa)	Кратность снижения относительно ®NovoSeven
®NovoSeven	0,93	52487	1,0
MOD-5014, партия 73	1,4	25490	2,05
MOD-5019, партия 9	3,0	11698	4,48

План исследования.

Наиболее значимой мерой является способность белка вызывать свертывание крови *in vivo* после травматического случая. Чтобы оценить способность MOD-5014 останавливать кровотечение, использовали ту же модель мышей, лишенных FVIII, для теста с кровотечением.

Мышам, лишенным FVIII, вводили однократной подкожной инъекцией MOD-5014, MOD-5019 или NovoSeven®. Группам А и В вводили дозу NovoSeven® и MOD-5014, соответственно, в эквивалентных количествах по активности FVIIa. Группе С вводили дозу MOD-5019 в эквивалентном количестве белка FVIIa, что и в дозе MOD-5014, чтобы оценить решающий фактор (активность или количество белка). Введенные дозы составляли 4,2 мг/кг NovoSeven® и 8,6 мг/кг MOD-5014 и MOD-5019. Хвостовую вену рассекали на расстоянии 2,7 см от кончика хвоста через 12 ч после введения и выживаемость мышей регистрировали в течение 24 ч.

Таблица 54. Обозначение групп

Группа	Дата инъекции	Исследуемый препарат	Вводимая доза		Инъекцируемый объем (мкл)	Кол-во мышей на группу	Время кровотечения, часы после введения
			мг FVII /кг	мЕд./кг			
А	13.1.13	®NovoSeven	4,23	221876	100	10	12
В	15.1.13	MOD-5014, партия 73	8,59	218750	160	10	12
С	27.1.13	MOD-5019, партия 9	8,59	100496	160	10	12

Результаты.

Результаты эксперимента кратко описаны в табл. 55 и на фиг. 34.

Таблица 55. Результаты исследования РХВ

Время после РХВ (ч)	Кол-во выживших мышей			% выживаемости		
	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019
0	9	10	10	100	100	100
1	9	10	10	100	100	100
2	9	10	10	100	100	100
3	8	10	8	89	100	80
4	6	9	8	67	90	80
5	5	9	7	56	90	70
6	4	8	5	44	80	50
7	3	8	5	33	80	50
8	2	7	5	22	70	50
9	1	6	5	11	60	50
10	1	5	5	11	50	50
11	1	3	5	11	30	50
12	1	3	5	11	30	50
24	1	3	4	11	30	40

Через 24 ч после РХВ, выжило лишь 11% мышей, которым ввели путем инъекции NovoSeven®. 30% мышей, которым инъецировали MOD-5014, и 40% мышей, которым инъецировали MOD-5019, выжило к данному моменту времени. Подкожная инъекция MOD-5014 и MOD-5019 привела к улучшенной выживаемости мышей по сравнению с NovoSeven®. Тем не менее, результаты не были оптимальными, поскольку более чем 50% животных погибло при проведении эксперимента.

Фактор VIIa, подобно другим факторам свертывания крови, обычно вводят путем внутривенной инъекции, для того чтобы он попал непосредственно в кровоток. Тем не менее, в настоящем изобретении показали, что композиции, предусмотренные в настоящем тексте, неожиданно более эффективно попадают в кровоток после п/к введения. Возможность подкожного введения FVIIa дает преимущество, так как подкожное введение FVIIa обеспечивает возможность профилактического применения. Подкожные инъекции пациентам также гораздо легче вводить самим себе, и они дают преимущество, когда пациенты очень молоды и их вены малы, и их трудно обнаружить.

Следовательно, подкожное введение можно применять для профилактического лечения.

Пример 9. Сравнительное исследование ФК-ФД рекомбинантного MOD-5014 по сравнению с NovoSeven® после подкожного введения крысам SD.

Цели исследования.

Определить фармакокинетические и фармакодинамические параметры MOD-5014 по сравнению с доступным для приобретения rFVIIa у крыс SD после однократного п/к введения.

Сравнить два независимых эксперимента (05010 и 05034) с продуктами MOD-5014, полученными из двух различных клонов (клон № 28 по сравнению с № 61), по их фармакокинетическим параметрам.

Экспериментальные методы.

Животные.

24 самца крыс SD прибыли из Harlan Laboratories Israel, Ltd, по меньшей мере за 4 дня до начала введения инъекций. Животные представляли собой здоровых молодых взрослых крыс массой ~200 г к началу исследования. Отклонение массы тела животных к моменту начала лечения не должно было превышать  $\pm 20\%$  от средней массы каждого пола. Состояние здоровья животных, используемых в данном исследовании, изучали по прибытии. Только здоровых животных акклиматизировали к лабораторным условиям и использовали для исследования.

Анализ свертывания крови FVIIa - STACLOT VIIa-Rtf.

Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rTF), используемый в данном анализе, специфичен к FVIIa, что используют для создания теста свертывания крови FVIIa. RstF, в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов, вызывает свертывание плазмы без активации FVII в FVIIa.

Наблюдаемое время свертывания крови в данной системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в исследуемом образце и не зависит от присутствия FVII в образце.

Активность FVIIa оценивали как для NovoSeven® после восстановления влагосодержания, так и для MOD-5014 перед каждым исследованием. Удельную активность FVIIa рассчитывали на основании A280. При сравнении удельной активности двух молекул, которые отличаются по молекулярной массе, нужно внести корректировку для того, чтобы нормировать активность (т.е. вследствие различия в молекулярной массе, количество активных сайтов в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раз больше, чем в MOD-5014).

Программное обеспечение PK solver.

Фармакокинетические параметры рассчитывали, применяя программное обеспечение PK solver. Кривую в/в введения анализировали с помощью двухкомпарментного анализа (CA) введения болюсной дозы, а затем п/к введение анализировали с помощью некомпартментного анализа (NCA) внесосудистого введения -линейно-логарифмического метода трапеций. Рассчитывали характеристики периода полу-

жизни, AUC, клиренса и объема распределения и исследовали параметры вывода путем сравнения между экспериментальными группами.

Экспериментальные материалы.

Эксперимент № 05010.

А. NovoSeven® RT: (партия № AU61553, получали 31.7.12\*). Концентрация FVIIa на A280: 0,86 мг/мл. Анализ активности FVIIa Staclot: 56867 ед./мг. Инъецируемая доза: 946 мкг/кг. \*Пул аликвот NovoSeven®, все из одного и того же № партии.

В. Клон 28. MOD-5014 RS12-001: 0,77 мг/мл\*\* на основании A280. Анализ активности FVIIa Staclot: 34162 ед./мг. Инъецируемая доза: 850 мкг FVIIa/кг.

Эксперимент № 05034.

А. NovoSeven® RT: (партия № AU61347, получали 1.1.13). Концентрация FVIIa на A280: 0,82 мг/мл, разбавляли до 0,4 мг/мл стерильным буфером NS. Анализ активности FVIIa Staclot: 55688 ед./мг. Инъецируемая доза: 360 мкг/кг и 20047,7 ед./кг.

В. Клон 61. MOD-5014, партия 75: 1,9 мг/мл\*\* на основании A280, разбавляли до 0,89 мг/мл рецептурным буфером. Инъецируемая доза: 20047,7 ед./кг. Свертывающая активность FVIIa: 25002\* ед./мг на основании анализа активности FVIIa Staclot.

С. Клон 61. MOD-5014, партия 81А: 2,36 мг/мл на основании A280 (фильтровали утром в день исследования и перемеряли на 280 нм), разбавляли до 0,4 мг/мл рецептурным буфером. Инъецируемая доза: 360 мкг FVIIa/кг. Свертывающая активность FVIIa: 24943 ед./мг на основании анализа активности FVIIa Staclot.

Д. Клон 61. MOD-5014, партия 81А: 2,36 мг/мл на основании A280, разбавляли до 0,89 мг/мл рецептурным буфером. Инъецируемая доза: 20047,7 ед./кг. Свертывающая активность FVIIa: 24943 ед./мг на основании анализа активности FVIIa Staclot.

План исследования.

Эксперимент № 05010.

MOD-5014 и NovoSeven® вводили однократной внутривенной или подкожной инъекцией крысам SD в дозе 0,9 мг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48 и 58 ч после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Данное исследование проводили в научном парке "Science in Action", Нес-Циона, Израиль. Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa и проводили тщательный ФК анализ в Prolog-Biotech.

Таблица 55. Дизайн исследования 05010

Группы лечения	Исследуемый препарат	Кол-во животных /группа	Количество во животных / группу/ момент времени	Путь введения	Пол	Уровень дозы (мкг/кг)	Инъецируемый объем (мкл)	Моменты времени (часы после введения)
A	rFVIIa (Novo Seven®)	6	3	в/в	м	946	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
B	rFVIIa RS12-001 (клон 28)	6	3	в/в	м	850	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
C	rFVIIa (Novo Seven®)	6	3	п/к	м	946	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
D	rFVIIa RS12-001 (клон 28)	6	3	п/к	м	850	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58

Эксперимент № 05034.

MOD-5014 и NovoSeven® вводили однократной подкожной инъекцией крысам SD в дозе 0,9 мг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48 и 72 ч после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Данное исследование проводили в "Science in Action", Нес-Циона.

Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa и проводили тщательный ФК анализ в Prolog-Biotech.

Таблица 56. Дизайн исследования 05034

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество животных/группу/момент времени ***	Путь введения	Пол	Уровень дозы на животное (мкг/кг)	Уровень дозы на животное (ед./кг)	Ињекции объем (мкл)	Моменты времени (часы после введения)
A	FVIIa (NovoSeven®)	3	п/к	м	360	20047,7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
B	FVIIa 75 (клон 61)	3	п/к	м	801,84	20047,7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
C	FVIIa 81A (клон 61)	3	п/к	м	360	8979,48	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
D	FVIIa 81A (клон 61)	3	п/к	м	803,74	20047,7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72

Результаты.

Осуществляли количественный анализ активности FVIIa в образцах крови, применяя набор STA-CLOT VIIa-rTF (Stago). Рассчитывали фармакокинетический профиль для каждого белка, и он представлял собой среднее значение по 3 животным в каждый момент времени.

Эксперимент № 05010.

После вычитания фона: 15 мЕд./мл.

На фиг. 35 представлен ФК профиль FVIIa после в/в и п/к введения либо NovoSeven®, либо MOD-5014. Краткое описание значений активности FVIIa в каждый момент времени представлено в табл. 57. ФК паттерны при в/в и п/к введении различаются (см. фиг. 35; после вычитания фона: 15 мЕд./мл). Cmax после в/в инъекции выше, чем таковая после п/к инъекции, вследствие попадания лекарственного средства в кровь незамедлительно после введения (измеряли через 0,5 ч, табл. 57 и 58). Тем не менее, после п/к введения молекулы лекарственного средства переносятся во внутриклеточный матрикс и ткани, таким образом, Cmax можно измерить лишь через 2 ч после инъекции. Общее извлечение лекарственного средства после п/к введения было меньше, чем значение Cmax после в/в инъекции.

Через 8 ч. после инъекции обнаружили, что NovoSeven® обладает одинаковым ФК паттерном при введении путем либо в/в, либо п/к инъекции (после вычитания фона: 15 мЕд./мл, фиг. 35). Более того, свертывающая активность у мышей, которых лечили NovoSeven®, не детектировалась в моменты времени после 12 ч, тогда как у мышей, которых лечили MOD-5014, продолжала сохраняться измеримая активность через 58 ч после введения (табл. 57; после вычитания фона: 15 мЕд./мл; фиг. 35).

Таблица 57. Свертывающая активность FVIIa MOD-5014 по сравнению с NovoSeven® после в/в или п/к введения

Время (ч.)	NovoSeven®, в/в (A)		MOD-5014, в/в (B)		NovoSeven®, п/к (C)		MOD-5014, п/к (D)	
	мЕд./мл	% КВ	мЕд./мл	% КВ	мЕд./мл	% КВ	мЕд./мл	% КВ
0,5	304651,7	18,7	232818,3	5,0	11491,7	2,4	3691,7	19,0
4	40068,3	7,8	62085,0	9,5	21385,0	22,6	12018,3	15,8
8	5276,7	2,5	25931,7	6,1	5525,0	32,5	6445,0	2,2
12	255,0	13,8	5633,3	9,3	297,7	41,4	924,7	24,1
24	1,3	7,1	251,3	11,8	1,3	89,2	249,3	60,3
34	0,0		78,3	4,5	0,0		63,7	85,5
48			29,0	9,9	0,0		35,0	47,2
58			10,3	4,6	0,0		13,7	33,5

После вычитания фона: 15 мЕд./мл.

Таблица 58. ФК параметры MOD-5014 по сравнению с NovoSeven® после в/в или п/к введения  
А. в/в

ФК параметры	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 (RS 12-001) (B)
Период полужизни-α (0,5 - 4 ч.)	0,24	1,04
Период полужизни-β (4 - 58 ч.)	1,31	3,17
AUC 0-беск., мЕд./мл*ч.	702467,95	820778,67
Vss (Ед./кг/(мЕд./мл))	0,13	0,13
CL ((Ед./кг)/(мЕд./мл)/ч.)	0,08	0,04
MRT (ч.)	1,74	3,62

В. п/к

ФК параметры	NovoSeven® RT (B)	MOD-5014 (RS 12-001) (C)
Период полужизни (ч.)	1,40	7,78
Стах (мЕд./мл)	21385,00	12018,33
AUC 0-беск. (мЕд./мл*ч.)	115099,72	84158,87
MRT 0-беск. (ч.)	4,32	7,04
Vz/F (Ед./кг)/(мЕд./мл)	0,95	3,88
CL/F (Ед./кг)/(мЕд./мл)/ч.	0,47	0,35

Vz/F - объем распределения в конечной фазе.

Эксперимент № 05034.

На фиг. 36 представлен ФК профиль FVII после п/к введения либо NovoSeven®, либо MOD-5014. Исследовали две различные партии клона номер 61 (№ 75 и 81) в одной и той же концентрации или с одними и теми же единицами активности, по сравнению с NovoSeven®. Краткое описание значений активности FVIIa в каждый момент времени представлено в табл. 59.

Результаты свидетельствуют о близком ФК паттерне после п/к введения, соответствующем предыдущим экспериментам. Более того, свертывающая активность у мышей, которых лечили NovoSeven®, не детектировалась в моменты времени после 12 ч, тогда как у мышей, которых лечили MOD-5014, продолжала сохраняться измеримая активность через 24 ч после введения (табл. 59 и фиг. 36; и после вычитания фона: 56 мЕд./мл (8, 12 ч) или 32 мЕд./мл (0,5, 2, 6, 14 ч)).

Значения Стах партии № 81 (D) клона номер 61 (1301 мЕд./мл) были ниже, чем значения Стах партии № 75 (B) клона номер 61 и NovoSeven® (A) (3521 мЕд./мл и 5908 мЕд./мл, соответственно), хотя их всех вводили путем инъекции в одном и том же количестве единиц активности (табл. 6). Тем не менее, у партий № 75 (B) и № 81 (D) наблюдалась почти одинаковая активность (559 мЕд./мл и 478 мЕд./мл, соответственно), которую измеряли через 8 ч. после инъекции (фиг. 36 и табл. 59; и после вычитания фона: 56 мЕд./мл (8, 12 ч) или 32 мЕд./мл (0,5, 2, 6, 14 ч)).

Таблица 59. Свертывающая активность FVIIa MOD-5014 (клон 61, партии № 75, 81) по сравнению с NovoSeven® после однократного п/к введения

Время (ч.)	NovoSeven® (A)		MOD-5014, клон 61, партия 75 (B) - равные ед./кг		MOD-5014, клон 61, партия 81A (C) - равная конц. FVIIa, мкг/кг		MOD-5014, клон 61, партия 81A (D) - равные ед./кг	
	мЕд./мл	% КВ	мЕд./мл	% КВ	мЕд./мл	% КВ	мЕд./мл	% КВ
0,5	3271,3	46,5	350,3	26,6	101,3	24,1	208,7	51,2
2	5908,0	18,1	3521,3	70,9	1294,7	7,0	1301,3	31,6
6	1411,7	23,6	1349,7	45,6	425,3	27,6	663,0	13,4
8	1029,0	12,4	559,3	52,7	152,7	19,5	478,0	25,4
12	121,3	9,9	563,0	17,4	148,7	36,3	712,7	16,2
24	1,0	25,0	117,0	41,9	21,3	36,4	99,0	36,7

После вычитания фона: 56 мЕд./мл (8, 12 ч) или 32 мЕд./мл (0,5, 2, 6, 14 ч).

Таблица 60. ФК параметры MOD-5014 (клон 61, партии № 75, 81) по сравнению с NovoSeven® после однократного п/к введения

ФК параметры	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014, клон 61, партия 75 (B) - равные ед./кг	MOD-5014, клон 61, партия 81A (C) - равная конц. FVIIa мкг/кг	MOD-5014, клон 61, партия 81A (D) - равные ед./кг
Период полужизни (ч.)	1,67	5,70	4,62	6,41
Stax (мЕд./мл)	5908,00	3521,33	1294,67	1301,33
AUC 0-беск. (мЕд./мл*ч.)	24688,18	20456,96	6260,23	13098,16
MRT 0-беск. (ч.)	3,73	7,86	6,40	10,59
Vz/F (Ед./кг)/(мЕд./мл)	1,96	8,06	9,55	14,15
CL/F (Ед./кг)/(мЕд./мл)/ч.	0,81	0,98	1,43	1,53

В настоящем изобретении кратко описаны два ФК исследования: 05010 и 05034. Нашей целью было дать определенное представление о влиянии присоединения СТР к FVII на период полужизни и клиренс белка при подкожном введении, а также исследовать его удельную активность после данной модификации. В данных исследованиях крысам SD вводили путем однократной п/к инъекции MOD-5014, полученный из двух клонов, и двух различных партий, и сравнивали с рекомбинантным доступным для приобретения FVIIa (NovoSeven®). Указанные компоненты вводили путем инъекции в сходных концентрациях FVIIa (мкг/кг) или на одном и том же уровне активности (ед./кг) и осуществляли анализ на основе ФК активности.

Основной целью первого исследования было сверить различные ФК параметры после в/в и п/к введения. На основании данного исследования мы можем заключить, что существует различие между ФК паттерном, измеренным после в/в или п/к введения.  $T^{1/2}$  после п/к инъекции MOD-5014 составлял 7,78 ч, и лишь 4,2 ч после в/в инъекции. Значения AUC были одинаковы (табл. 58).

Во втором исследовании, тем не менее, сосредоточились на различиях между двумя партиями MOD-5014 клон номер 61, который вводили путем инъекции в одной и той же концентрации FVIIa или в равных единицах активности, и сравнивали с NovoSeven®. В данном исследовании мы показали, что клон 61 партии № 75 проявил лучшие ФК параметры, чем партии № 81. У партии № 81, которую вводили путем инъекции на одном и том же уровне активности, Stax оказалась ниже по неизвестной причине. Более того, намеряли одинаковую Stax, когда вводили путем инъекции клон 61 партии № 81 в двух различных дозах (по концентрации FVIIa или по единицам активности), вместо 2,5-кратного различия между двумя значениями активности. После совместного анализа обоих исследований, мы можем прийти к заключению, что клон 28 проявил больший параметр  $t^{1/2}$ , чем клон 61 № 75 (лучшая партия) после п/к инъекции (7,78 и 5,7 ч, соответственно, табл. 60). Мы также можем прийти к заключению, что образцы в разные моменты времени дают различные ФК паттерны, что приводит к изменению ФК кривых. Паттерны указанных кривых могут нам дать большее представление о поведении лекарственного средства в крови. Следовательно, мы решили установить моменты времени, аналогичные таковым, обнаруженным в Baxter (0, 0,5, 2, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72 ч). Более того, концентрация FVIIa в эксперименте 05010 была слишком высокой, и ее заново измерили в следующем эксперименте (05034) с п/к введением. Для будущих ФК исследований мы решили вводить путем инъекции компонент в дозе 360 мкг FVIIa/кг.

В общей сложности, мы можем больше узнать о продукте MOD-5014 после п/к введения, чтобы определить клон и партию с наилучшим качеством и чтобы выявить наилучший способ определения количества инъекцируемого MOD-5014 - по концентрации или единицам активности FVIIa.

Хотя свойства настоящего изобретения были проиллюстрированы и описаны в настоящем тексте, средние специалисты в данной области теперь смогут придумать множество его модификаций, замен, изменений и эквивалентов. Следовательно, должно быть очевидно, что в объем прилагаемой формулы изобретения должны входить все такие модификации и изменения как явно входящие в объем настоящего изобретения.



Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 20 25

<210> 5  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР Праймер для Фактора VII

<400> 5  
 ctcdagggaca tggctctccca ggcsc 25

<210> 6  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР Праймер для Фактора VII

<400> 6  
 tctagaatag gtattttttcc acat 24

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР Праймер для Фактора VII

<400> 7  
 tctagaaaaa aaaaatgcsc gc 22

<210> 8  
 <211> 32  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР Праймер для Фактора VII

<400> 8  
 gcggccgcac cctcagggaa atggggctcg ca 32

<210> 9  
 <211> 444  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

## 044349

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
 20 25 30  
 Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
 35 40 45  
 Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
 50 55 60  
 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110  
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125  
 Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140  
 Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175  
 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190  
 Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205  
 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220  
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
435 440

<210> 10  
<211> 448  
<212> Бeлoк  
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
 35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
 50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
 85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln

044349

275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg  
 435 440 445

<210> 11  
 <211> 1356  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

ctcgaggaca tgggtctccca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcttggtg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgagg ccgggctccc tggagagggg gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgaggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtctatatc tgcttctgcc tcctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttctg gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc accactacc ggggcacgtg gtacctgacg 1200  
 ggcatcgtca gctggggcca gggctgcgca accgtgggccc actttggggg gtacaccagg 1260  
 gtctcccagt acatcgagtg gctgcaaaag ctcatgcgct cagagccacg cccaggagt c 1320  
 ctctgcgag cccatttcc ctgaggatgc ggccgc 1356

<210> 12  
 <211> 1442  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 12  
 ctcgaggaca tggctctcca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60  
 tgcttggtcag cagtcttctg aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120  
 cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagagggga gtgcaaggag 180  
 gagcagtgct ccttcgagga gggccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240  
 ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggg 300  
 tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tcctgcctt cgagggccgg 360  
 aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420  
 cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacacccat ctgggtgggc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcacc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag cccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgctggggcc cagcgacacc cccatcctgc cccagtgagg atccgcggcc 1440  
 gc 1442

<210> 13  
 <211> 472  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 13

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
85 90 95

## 044349

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser  
 435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro  
 450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 465 470

- <210> 14
- <211> 1535
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность

- <220>
- <223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 14  
 ctcgaggaca tggctctcca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60  
 tgcctggctg cagtcttctg aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120  
 cgcgccaacg cgttctctgga ggagctgctg ccgggctccc tggagagggg gtgcaaggag 180  
 gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgaggagag gacgaagctg 240  
 ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggg 300  
 tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360  
 aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420  
 cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acgggggtgt ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttggttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacacccat ctgggtgggc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatt atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcattcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag cccccctccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgctggggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctctaaag 1440  
 gcccctctc catccctgcc atccccctcc cggtgcccag gcccctctga caccctatc 1500  
 ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 1535

<210> 15

<211> 500

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 15

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
65 70 75 80

## 044349

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
 85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

044349

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser  
 435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro  
 450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro  
 465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro  
 485 490 495

Ile Leu Pro Gln  
 500

<210> 16  
 <211> 1404  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatt 60  
 gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat gaaaacgcca 120  
 acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag tttgttcaag 180  
 ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca cgagaagttt 240  
 ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga gatcagtgtg 300  
 agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatggt 360

## 044349

ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt aacattaaga 420  
 atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtgggtt tgctcctgta 480  
 ctgagggata tgcacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg ccatttccat 540  
 gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccog tgctgagact gtttttcctg 600  
 atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaagca 660  
 cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttgggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat 720  
 tcccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc tctatcgtta 780  
 atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaaac tgggtgttaa attacagttg 840  
 tgcgaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc 900  
 gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacatc gacattgcc 960  
 ttctggaact ggacgaacct ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg 1020  
 acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080  
 gagtcttcca caaagggaga tcagcttttag ttctccagta ccttagagtt ccacttgttg 1140  
 accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200  
 gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260  
 aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggtgaagag tgtgcaatga 1320  
 aaggcaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380  
 caaagctcac ttgaacgcgg ccgc 1404

<210> 17  
 <211> 461  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr  
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu  
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn  
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys  
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn  
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln  
 85 90 95  
 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile  
 100 105 110  
 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys  
 115 120 125  
 Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe  
 130 135 140  
 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
 165 170 175  
 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
 180 185 190  
 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
 195 200 205  
 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
 210 215 220  
 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp  
 225 230 235 240  
 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
 245 250 255  
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
 275 280 285  
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
 325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
 340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
 355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
 370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
 385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
 405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
 420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
 435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr  
 450 455 460

<210> 18  
 <211> 1502  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 18  
 gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgac atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60  
 tgccttttag gatatctact cagtgtgtaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120  
 aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180  
 gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240  
 ttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagttg 300  
 gagtccaatc catgtttaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360  
 tgggtgtcct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420  
 aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaagggtgt ttgctcctgt 480  
 actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540  
 tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcacc gtgctgagac tgtttttcct 600

gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660  
accaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgccaa accaggtcaa 720  
ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt 780  
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840  
gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900  
cgaattattc ctaccacaaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960  
cttctggaac tggacgaacc cttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020  
gacaaggaat acacgaacat cttoctcaaa tttggatctg gctatgtaag tggctgggga 1080  
agagtcttcc acaaagggag atcagcttta gttcttcagt accttagagt tccacttgtt 1140  
gaccgagcca catgtcttcg atctacaaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgct 1200  
ggcttccatg aaggaggtag agattcatgt caaggagata gtggggggacc ccatgttact 1260  
gaagtggaag ggaccagttt cttaaactgga attattagct ggggtgaaga gtgtgcaatg 1320  
aaaggcaaat atggaatata taccaaggta tcccggtatg tcaactggat taaggaaaaa 1380  
acaaagctca ctagctccag cagcaaggcc cctccccga gcctgccctc cccaagcagg 1440  
ctgcctgggc cctccgacac accaatcctg ccacagtgat gaaggtctgg atccgcggcc 1500  
gc 1502

<210> 19

<211> 489

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 19

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr  
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu  
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn  
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys  
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn  
65 70 75 80

044349

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln  
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile  
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys  
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe  
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp  
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
325 330 335

## 044349

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser  
450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
485

<210> 20

<211> 1585

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 20

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60

tgccttttag gatatctact cagtgctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120

aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180

gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240

tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atggtgatgg agatcagtg 300

gagtccaatc catgtttaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360

tggtgtccct ttggatttga aggaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420

aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaaggtggt ttgctcctgt 480  
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540  
tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcaccg gtgctgagac tgtttttcct 600  
gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660  
acccaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgcca accaggtcaa 720  
ttcccttggc aggttggtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt 780  
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840  
gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900  
cgaattattc ctaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960  
cttctggaac tggacgaacc cttagtgtta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020  
acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080  
gagtcttcca caaagggaga tcagcttttag ttcttcagta ccttagagtt ccaactgttg 1140  
accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200  
gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260  
aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggtgaagag tgtgcaatga 1320  
aaggcaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380  
caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgccctcc ccaagcaggc 1440  
tgctggggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctccctctaa gccctcctc 1500  
catccctgcc atccccctcc cggctgctg gccctctga caccctatc ctgcctcagt 1560  
gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 1585

<210> 21

<211> 517

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 21

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr  
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu  
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn  
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys  
 50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn  
 65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln  
 85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile  
 100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys  
 115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe  
 130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
 165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
 180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
 210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp  
 225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
 245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
 260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
 275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
 290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser  
450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
485 490 495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln  
515

<210> 22

<211> 2413

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 22  
tctagagtcg accccgccat ggagctgagg ccctggttgc tatgggtggt agcagcaaca 60  
ggaaccttgg tcctgctagc agctgatgct cagggccaga aggtcttcac caacacgtgg 120  
gctgtgcgca tccttgagg cccagcggtg gccaacagtg tggcacggaa gcatgggttc 180  
ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccacttct ggcatcgagg agtgacgaag 240  
cggtcctgt cgcctcaccg cccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag 300  
tggctggaac agcaggtggc aaagcgacgg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca 360  
gaccccaagt ttctcagca gtggtacctg tctggtgtca ctcagcggga cctgaatgtg 420  
aaggcggcct gggcgcaggg ctacacaggg cacggcattg tggctctccat tctggacgat 480  
ggcatcgaga agaaccaccc ggacttggca ggcaattatg atcctggggc cagttttgat 540  
gtcaatgacc aggacctga cccccagcct cggtagacac agatgaatga caacaggcac 600  
ggcacacggg gtgcggggga agtggctgcg gtggccaaca acggtgtctg tgggttaggt 660  
gtggcctaca acgcccgcct tggaggggtg cgcctgctgg atggcgaggt gacagatgca 720  
gtggaggcac gctcgctggg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg 780  
ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcgccga ggaggccttc 840  
ttccgtgggg ttagccaggg ccgagggggg ctgggctcca tctttgtctg ggcctcgggg 900  
aacggggggc gggaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacacg 960  
ctgtccatca gcagcggcc gacgtttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggcctgctcg 1020  
tccacactgg ccacgacct aagcagtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact 1080  
gacttgccgc agaagtgcac ggagtctcac acgggcacct cagcctctgc ccccttagca 1140  
gccggcatca ttgctctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa 1200  
cacctggtgg tacagacct gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat 1260  
ggtgtggggc ggaaagtgag cactcatat ggctacgggc ttttgacgc aggcgccatg 1320  
gtggccctgg cccagaattg gaccacagtg gccccccagc ggaagtgcac catcgacatc 1380  
ctcaccgagc ccaaagacat cgggaaacgg ctcgaggtgc ggaagaccgt gaccgcgtgc 1440  
ctgggagcag ccaaccacat cactcggctg gagcacgctc aggcgaggct caccctgtcc 1500  
tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggtcagcc ccatgggcac ccgctccacc 1560  
ctgctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggccttcatg 1620  
acaactcatt cctgggatga ggatccctct ggcgagtggt tcctagagat tgaaaacacc 1680  
agcgaagcca acaactatgg gacgctgacc aagttcacc tcgtactcta tggcaccgcc 1740  
cctgagggggc tgcccgtacc tcagaaaagc agtggctgca agaccctcac gtccagtcat 1800  
gcctgtgtgg tgtgcgagga aggcttctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc 1860

044349

cctccaggct tcgcccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag 1920  
 accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cacgcctcat gtgccacatg ccaggggccc 1980  
 gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cacgcctcct tggaccctgt ggagcagact 2040  
 tgctcccggc aaagccagag cagccgagag tccccgccac agcagcagcc acctcggctg 2100  
 cccccggagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgctgcctc acacctgcct 2160  
 gaggtggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttctg 2220  
 gtctgcagc tgcgctctgg ctttagtttt cgggggggtga aggtgtacac catggaccgt 2280  
 ggctcatct cctacaaggg gctgccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac 2340  
 tcagaagagg acgagggccc gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgcctc 2400  
 tgaacgcggc cgc 2413

<210> 23  
 <211> 794  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn  
 20 25 30  
 Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr  
 50 55 60  
 Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu  
 85 90 95  
 Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu  
 100 105 110  
 Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr  
 115 120 125  
 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly  
 130 135 140

## 044349

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His  
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn  
 165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn  
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn  
 195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val  
 210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu  
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro  
 245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu  
 260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile  
 275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn  
 290 295 300

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala  
 305 310 315 320

Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr  
 325 330 335

Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val  
 340 345 350

Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser  
 355 360 365

Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala  
 370 375 380

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr  
 385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val  
 405 410 415

Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly  
 420 425 430

Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg  
 435 440 445

Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg  
 450 455 460

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His  
 465 470 475 480

Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn  
 485 490 495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg  
 500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe  
 515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser  
 530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr  
 545 550 555 560 565

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu  
 565 570 575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser  
 580 585 590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys  
 595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp  
 610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val  
 625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu

044349

	645		650		655														
Thr	Asp	Cys	Leu	Ser	Cys	Pro	Ser	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Val	Glu				
			660					665					670						
Gln	Thr	Cys	Ser	Arg	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Arg	Glu	Ser	Pro	Pro	Gln				
		675					680					685							
Gln	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu				
	690					695					700								
Arg	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Ser	His	Leu	Pro	Glu	Val	Val	Ala	Gly	Leu				
705					710					715					720				
Ser	Cys	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Val	Phe	Val	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Leu				
			725					730						735					
Gln	Leu	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Gly	Val	Lys	Val	Tyr	Thr	Met				
			740					745					750						
Asp	Arg	Gly	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Ala	Trp	Gln				
		755					760					765							
Glu	Glu	Cys	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Asp	Glu	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg				
	770					775					780								
Thr	Ala	Phe	Ile	Lys	Asp	Gln	Ser	Ala	Leu										
785					790														

<210> 24  
 <211> 1621  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 24  
 ctcgaggaca tggctctccca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60  
 tgcttgctg cagtcttctg aaccagagg gaagcccacg gcgtctgca ccggcgccgg 120  
 cgcgccaacg cgttctgga ggagctgagg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180  
 gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgaggagag gacgaagctg 240  
 ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300  
 tcctgcaagg accagctcca gtctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360  
 aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420  
 cagtactgca gtgaccacac gggcaccagg cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtgggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttctg gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcacgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgctggggcc cagtgcaccc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1440  
 gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gcccagcga tactccaatt 1500  
 ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1560  
 ccaggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgcggc cgcttaatta 1620  
 a 1621

<210> 25

<211> 528

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 25

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
 20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
 35 40 45

## 044349

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
 50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
 85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300

## 044349

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser  
435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro  
450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro  
465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro  
485 490 495

Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro  
500 505 510

Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
515 520 525

<210> 26

<211> 1607

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; СТР-модифицированный Фактор VII

&lt;400&gt; 26

```

ctcgaggaca tggctctcca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc      60
tgcttggtg cagtcttctg aaccagagg gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg      120
cgcgccaacg cgttctctgga ggagctgagg ccgggctccc tggagagggg gtgcaaggag      180
gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg      240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc      300
tcctgcaagg accagctcca gtctatatac tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg      360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag      420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct      480
ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct      540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc      600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttgggtg atggagctca gttgtgtggg      660
gggaccctga tcaacacat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag      720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat      780
gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcacc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc      840
aaccagaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtgggtg      900
cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttctg gcgcttctca      960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc     1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac     1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc     1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc accactacc ggggcacgtg gtacctgacc     1200
ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg     1260
gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg     1320
ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgccccagc     1380
cctagcagac tgctggggcc cagtgcacc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag     1440
gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt     1500
ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg     1560
ccaggccctt ctgatacacc catcctcca cagtgatgag gatccgc                       1607

```

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 532

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; СТР-модифицированный Фактор VII

&lt;400&gt; 27

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala  
 20 25 30

His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu  
 35 40 45

Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser  
 50 55 60

Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu  
 65 70 75 80

Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys  
 85 90 95

Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe  
 100 105 110

Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp  
 115 120 125

Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser  
 130 135 140

Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser  
 145 150 155 160

Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys  
 165 170 175

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly  
 180 185 190

Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln  
 195 200 205

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile  
 210 215 220

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys



044349

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
 485 490 495

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro  
 500 505 510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile  
 515 520 525

Leu Pro Gln Gly  
 530

<210> 28  
 <211> 1775  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 28  
 ctcgaggaca tggctctcca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60  
 tgcctggctg cagtcttcgt aaccagggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120  
 cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgctg ccgggctccc tggagagggga gtgcaaggag 180  
 gagcagtgct ccttcgagga ggcctgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240  
 ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggg 300  
 tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcctctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360  
 aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420  
 cagtactgca gtgaccacac gggcaccacg cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccagggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

044349

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag cccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgcttggggc ctctgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctctctaaag 1440  
 gctccaccac cttccctgcc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt 1500  
 ctgccccagt cctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgctttctcc atcaaggctg 1560  
 cctggcccat ccgatacccc aatthtgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc 1620  
 agtctgcct ctccaagcag actccctggc ccttcagaca ctccaatcct cccacagtcc 1680  
 tctagctcta aagctccacc tcccagcctg cccagcccta gtagactccc cggaccttct 1740  
 gatacccccca tcttgcccca gtgatgagga tccgc 1775

<210> 29  
 <211> 589  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор VII

<400> 29

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala  
 20 25 30

His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu  
 35 40 45

Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser  
 50 55 60

Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu  
 65 70 75 80

Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys  
 85 90 95

Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe  
 100 105 110

Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp  
 115 120 125

Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser  
 130 135 140

Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser  
 145 150 155 160

Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys  
 165 170 175

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly  
 180 185 190

Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln  
 195 200 205

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile  
 210 215 220

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys  
 225 230 235 240

Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu  
 245 250 255

His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro  
 260 265 270

Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg  
 275 280 285

Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu  
 290 295 300

Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser  
 305 310 315 320

Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu  
 325 330 335

Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu  
 340 345 350

Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met  
 355 360 365

Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp



<400> 30  
 tctagagtcg accccgccat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc 60  
 atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat 120  
 gaaaacgcc acaaaattct gaatcggcca aagaggata attcaggtaa attggaagag 180  
 tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca 240  
 cgagaagttt ttgaaaacac tgaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga 300  
 gatcagtgtg agtccaatcc atgttttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc 360  
 tatgaatggt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt 420  
 aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caagggtggt 480  
 tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg 540  
 ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccgg tgctgaggca 600  
 gtttttctcg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc 660  
 actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtgagaga agatgccaaa 720  
 ccaggtcaat tccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc 780  
 tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac tgggtgtaaa 840  
 attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga 900  
 aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacct 960  
 gacattgccc ttctggaact ggacgaacc ttagtctaa acagctacgt tacacctatt 1020  
 tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt 1080  
 ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt 1140  
 ccacttgttg accgagccac atgtcttoga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg 1200  
 ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc 1260  
 catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggggaagag 1320  
 tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggat cccggtatgt caactggatt 1380  
 aaggaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgccctcc 1440  
 ccaagcaggc tgctggggcc cagtgcaccc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1500  
 gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gcccagcga tactccaatt 1560  
 ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1620  
 ccaggccctt ctgatacacc catcctcca cagtgatgag gatccgcggc cgc 1673

<210> 31

<211> 545

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; СТР-модифицированный Фактор IX

&lt;400&gt; 31

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr  
 1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu  
 20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn  
 35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys  
 50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn  
 65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln  
 85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile  
 100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys  
 115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe  
 130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
 165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
 180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
 210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp  
 225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
 245 250 255  
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
 275 280 285  
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
 325 330 335  
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
 340 345 350  
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
 355 360 365  
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
 370 375 380  
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
 385 390 395 400  
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
 405 410 415  
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
 420 425 430  
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
 435 440 445  
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser  
 450 455 460  
 Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro

## 044349

485

490

495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
 500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu  
 515 520 525

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro  
 530 535 540

Gln  
 545

<210> 32  
 <211> 1757  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 32  
 tctagagtcg accccgscat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc 60  
 atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgcgtgaat gtacagtttt tcttgatcat 120  
 gaaaacgcca acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag 180  
 tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca 240  
 cgagaagttt ttgaaaacac tgaagaaca actgaatfff ggaagcagta tgttgatgga 300  
 gatcagtggtg agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc 360  
 tatgaatggt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt 420  
 aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt 480  
 tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg 540  
 ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccocg tgctgaggca 600  
 gtttttctcg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc 660  
 actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa 720  
 ccaggtcaat tcccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc 780  
 tctatcgтта atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgттgaaac tggтgттaaa 840  
 attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga 900  
 aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacat 960  
 gacattgcc ttctggaact ggacgaacc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt 1020  
 tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgтаagt 1080

ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt 1140  
 ccacttgttg accgagccac atgtcttoga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg 1200  
 ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc 1260  
 catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggatgaagag 1320  
 tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggat cccggtatgt caactggatt 1380  
 aaggaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctcccccgag cctgcccctcc 1440  
 ccaagcaggc tgcttgggccc ctctgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctctctctaa 1500  
 gccccaccac ctccctgccc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt 1560  
 ctgccccagt cctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgcttctctcc atcaaggctg 1620  
 cctggcccat ccgatacccc aatthtgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc 1680  
 agtctgccct ctccaagcag actccctggc ccttcagaca ctcccattct gccacagtga 1740  
 tgaggatccg cggccgc 1757

<210> 33

<211> 583

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 33

Ser Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu  
1 5 10 15

Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala  
20 25 30

Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn  
35 40 45

Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly  
50 55 60

Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln  
85 90 95

Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly  
100 105 110

## 044349

Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly  
 115 120 125

Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn  
 130 135 140

Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val  
 145 150 155 160

Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys  
 165 170 175

Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr  
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val  
 195 200 205

Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr  
 210 215 220

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys  
 225 230 235 240

Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala  
 245 250 255

Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala  
 260 265 270

His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His  
 275 280 285

Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg  
 290 295 300

Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His  
 305 310 315 320

Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr  
 325 330 335

Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu  
 340 345 350

Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys  
 355 360 365

Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp  
 370 375 380

Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met  
 385 390 395 400

Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp  
 405 410 415

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr  
 420 425 430

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly  
 435 440 445

Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr  
 450 455 460

Lys Leu Thr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser  
 465 470 475 480

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser  
 485 490 495

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu  
 500 505 510

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys  
 515 520 525

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
 530 535 540

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro  
 545 550 555 560

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile  
 565 570 575

Leu Pro Gln Gly Ser Ala Ala  
 580

<210> 34

<211> 1840

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; СТР-модифицированный Фактор IX

&lt;400&gt; 34

ctagagtcga ccccgccatg cagcgcgtga acatgatcat ggcagaatca ccaggcctca	60
tcaccatctg ccttttagga tatctactca gtgctgaatg tacagttttt cttgatcatg	120
aaaacgcca caaaattctg aatcggcca agaggtataa ttcaggtaa ttggaagagt	180
ttgttcaagg gaaccttgag agagaatgta tggaagaaaa gtgtagtttt gaagaagcac	240
gagaagtttt tgaaaacact gaaagaacaa ctgaattttg gaagcagtat gttgatggag	300
atcagtgtga gtccaatcca tgtttaaatg gcggcagttg caaggatgac attaattcct	360
atgaatgttg gtgtcccttt ggatttgaag gaaagaactg tgaattagat gtaacatgta	420
acattaagaa tggcagatgc gagcagtttt gtaaaaatag tgctgataac aagggtggttt	480
gctcctgtac tgagggatat cgacttgacag aaaaccagaa gtcctgtgaa ccagcagtgc	540
catttccatg tggaagagtt tctgtttcac aaacttctaa gtcacccgt gctgaggcag	600
tttttctga tgtggactat gtaaattcta ctgaagctga aaccattttg gataacatca	660
ctcaaagcac ccaatcattt aatgacttca ctcgagttgt tggaggagaa gatgccaaac	720
caggtcaatt cccttggcag gttgttttga atggtaaagt tgatgcattc tgtggaggct	780
ctatcgttaa tgaaaaatgg attgtaactg ctgcccactg tgttgaaact ggtgttaaaa	840
ttacagttgt cgcaggtgaa cataatattg aggagacaga acatacagag caaaagcgaa	900
atgtgattcg aattattcct caccacaact acaatgcagc tattaataag tacaaccatg	960
acattgccct tctggaactg gacgaaccct tagtgctaaa cagctacgtt acacctattt	1020
gcattgctga caaggaatac acgaacatct tcctcaaatt tggatctggc tatgtaagtg	1080
gctggggaag agtcttccac aaagggagat cagcttttagt tcttcagtac cttagagttc	1140
cacttgttga ccgagccaca tgtcttcgat ctacaaagtt caccatctat aacaacatgt	1200
tctgtgctgg ctccatgaa ggaggtagag attcatgtca aggagatagt gggggacccc	1260
atgttactga agtggaaggg accagtttct taactggaat tattagctgg ggtgaagagt	1320
gtgcaatgaa aggcaaatat ggaatatata ccaaggtatc ccggtatgtc aactggatta	1380
aggaaaaaac aaagctcact agctccagca gcaaggcccc tccccgagc ctgccctccc	1440
caagcaggct gcctgggccc tctgacaccc ctatcctgcc tcagtccagc tcctctaagg	1500
ctccaccacc ttccctgcct agcccttcaa gactgccagg ccctagcagat acaccaattc	1560
tgccccagtc ctccagcagc aaggctcccc cacctagcct gccttctcca tcaaggctgc	1620
ctggcccatc cgatacccca attttgctc agagcagctc tagcaaggca cctccccca	1680
gtctgcctc tccaagcaga ctccctggcc cttcagacac tccaatcctc ccacagtcct	1740
ctagctctaa agctccacct cccagcctgc ccagccctag tagactcccc ggaccttctg	1800

atacccccat cttgccccag tgatgaggat ccgcggccgc

1840

<210> 35  
 <211> 610  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> СТР-модифицированный Фактор IX

<400> 35

Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser  
 1 5 10 15

Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu  
 20 25 30

Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg  
 35 40 45

Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn  
 50 55 60

Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg  
 65 70 75 80

Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr  
 85 90 95

Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser  
 100 105 110

Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe  
 115 120 125

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly  
 130 135 140

Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys  
 145 150 155 160

Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu  
 165 170 175

Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser  
 180 185 190

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn



044349

Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys  
 450 455 460

Leu Thr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro  
 465 470 475 480

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser  
 485 490 495

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro  
 500 505 510

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala  
 515 520 525

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp  
 530 535 540

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser  
 545 550 555 560

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu  
 565 570 575

Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro  
 580 585 590

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser  
 595 600 605

Ala Ala  
 610

<210> 36  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 101 для FIX-(СТР)2

<400> 36  
 gtttagtgaa ccgtcagaat

20

<210> 37  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 103-R для FIX-(СТР)2

<400> 37  
 ttgaggaaga tgttcgtgta 20

<210> 38  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 98 для FIX-(СТР)2

<400> 38  
 attacagttg tcgcaagtgta 20

<210> 39  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 99-R для FIX-(СТР)2

<400> 39  
 gctggaagcta gtgagctttg ttttttcstt 30

<210> 40  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 100 для FIX-(СТР)2

<400> 40  
 gtcacatagc tcсаgсаgса агсс 25

<210> 41  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 27-R для FIX-(СТР)2

<400> 41  
 ttttcactgc attctagttg tgg 23

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер 75

<400> 42  
 ctcccaagttc aattacaagct 20

<210>	43	
<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер 122r	
<400>	43	
	ggaaaaactg cctcagcascg ggtgagc	27
<210>	44	
<211>	32	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер 123	
<400>	44	
	gtgctgaggc agtttttctct gatgtggact at	32
<210>	45	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер 124r	
<400>	45	
	саасасагтг ггсагсаг	18

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение модифицированного фактора свертывания крови карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина, состоящего из фактора свертывания крови и трех СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, в получении лекарственного средства для уменьшения избыточного кровотечения или ушиба у субъекта или для поддержания гемостаза при проведении хирургических процедур или при хирургических вмешательствах у субъекта, где указанный фактор свертывания крови содержит либо предшественник с N-концевым пропептидом, либо зрелый фактор свертывания крови без N-концевого пропептида, где указанный N-концевой пропептид содержит сигнальный пептид, где указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из: (а) СТР-модифицированного полипептида Фактора VII (FVII), имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит предшественник фактора свертывания крови, и аминокислоты 39-528 последовательности SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит зрелый фактор свертывания крови, и (b) СТР-модифицированного активированного полипептида Фактора VII (FVIIa), имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит предшественник фактора свертывания крови, и аминокислоты 39-528 последовательности SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит зрелый фактор свертывания крови.

2. Применение согласно п.1, где указанный субъект имеет уменьшенное время и интенсивность кровотечения после указанного применения.

3. Применение согласно п.1, где поддержание гемостаза включает поддержание гемостаза крови без повторения эпизодов кровотечения.

4. Применение согласно п.3, где поддержание гемостаза крови включает сохранение свертывающей активности.

5. Применение согласно любому из пп.1-4, где по меньшей мере один СТР гликозилирован.

6. Применение согласно любому из пп.1-5, где применение указанного лекарственного средства осуществляется посредством подкожного введения.

7. Применение согласно любому из пп.1-6, где субъект представляет собой ребенка.

8. Применение по любому из пп.1-7, где СТР-модифицированный FVII полипептид или СТР-модифицированный FVIIa полипептид содержит легкую цепь и тяжелую цепь, скрепленные дисульфидной связью.

9. Применение по п.8, где разделение указанной легкой цепи и указанной тяжелой цепи в ПА-АГ/ДСН геле происходит при денатурирующих условиях.

10. Применение по п.9, где указанная легкая цепь мигрирует на уровне молекулярной массы 25 кДа и указанная тяжелая цепь мигрирует на уровне молекулярной массы 50 кДа.

11. Применение по любому из пп.8-10, где дисульфидная связь присутствует при остатке 152 указанного фактора свертывания крови FVII или фактора свертывания крови FVIIa.

12. Применение по п.11, где указанная легкая цепь содержит аминокислоты 39-190 последовательности SEQ ID NO: 25 и указанная тяжелая цепь содержит аминокислоты 191-528 последовательности SEQ ID NO: 25.

13. Модифицированный фактор свертывания крови карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина, состоящий из фактора свертывания крови и трех СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, где указанный фактор свертывания крови содержит либо предшественник с N-концевым пропептидом, либо зрелый фактор свертывания крови без N-концевого пропептида, где указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови содержит связанную дисульфидной связью двухцепочечную гетеродимерную структуру, где указанный N-концевой пропептид содержит сигнальный пептид, где указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из: (а) СТР-модифицированного полипептида Фактора VII (FVII), имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит предшественник фактора свертывания крови, и аминокислоты 39-528 последовательности SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит зрелый фактор свертывания крови, и (б) СТР-модифицированного активированного полипептида Фактора VII (FVIIa), имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит предшественник фактора свертывания крови, и аминокислоты 39-528 последовательности SEQ ID NO: 25, где указанный фактор свертывания крови содержит зрелый фактор свертывания крови.

14. СТР-модифицированный фактор свертывания крови по п.13, где СТР-модифицированный FVII полипептид или СТР-модифицированный FVIIa полипептид содержит легкую цепь и тяжелую цепь, скрепленные дисульфидной связью.

15. СТР-модифицированный фактор свертывания крови по п.14, где разделение указанной легкой цепи и указанной тяжелой цепи в ПААГ/ДСН геле происходит при денатурирующих условиях.

16. СТР-модифицированный фактор свертывания крови по п.15, где указанная легкая цепь мигрирует на уровне молекулярной массы 25 кДа и указанная тяжелая цепь мигрирует на уровне молекулярной массы 50 кДа.

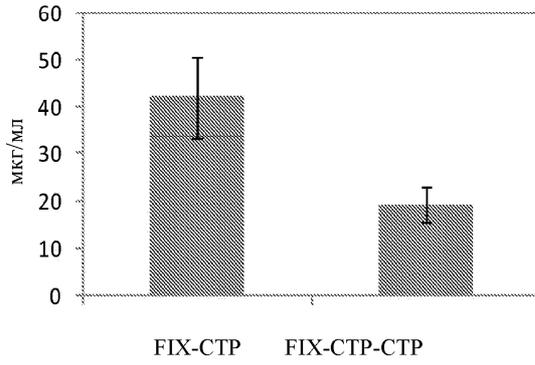
17. СТР-модифицированный фактор свертывания крови по любому из пп.13-16, где дисульфидная связь присутствует при остатке 152 указанного фактора свертывания крови FVII или фактора свертывания крови FVIIa.

18. СТР-модифицированный фактор свертывания крови по п.17, где указанная легкая цепь содержит аминокислоты 39-190 последовательности SEQ ID NO: 25 и указанная тяжелая цепь содержит аминокислоты 191-528 последовательности SEQ ID NO: 25.

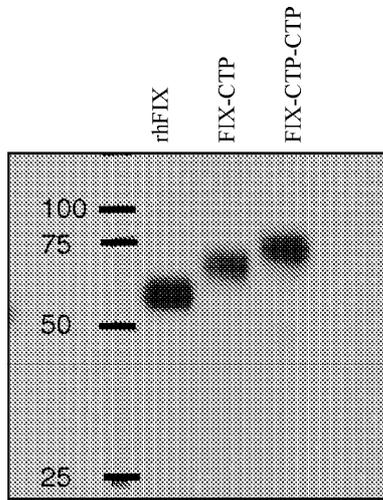
19. Фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный фактор свертывания крови, как определен в любом из пп.13-18, и фармацевтически приемлемый носитель.

Уровень АГ собранного фактора IX – ELISA

Фигура 1А

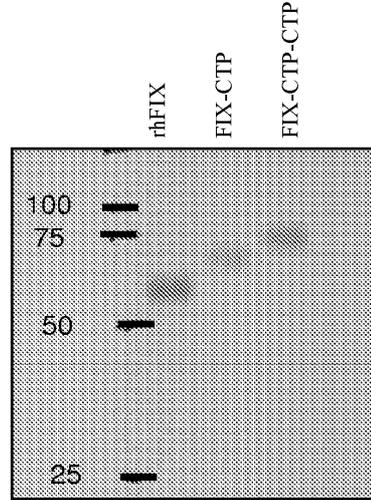


Фигура 1В



Вестерн-блот: АТ к FIX  
100 нг (собранных)

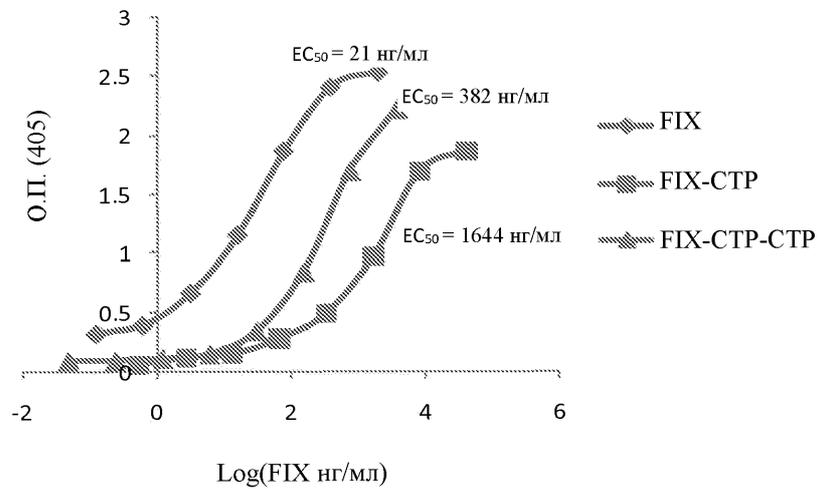
Фигура 1С



Вестерн-блот: АТ,  
распознающие гамма-  
карбоксилирование

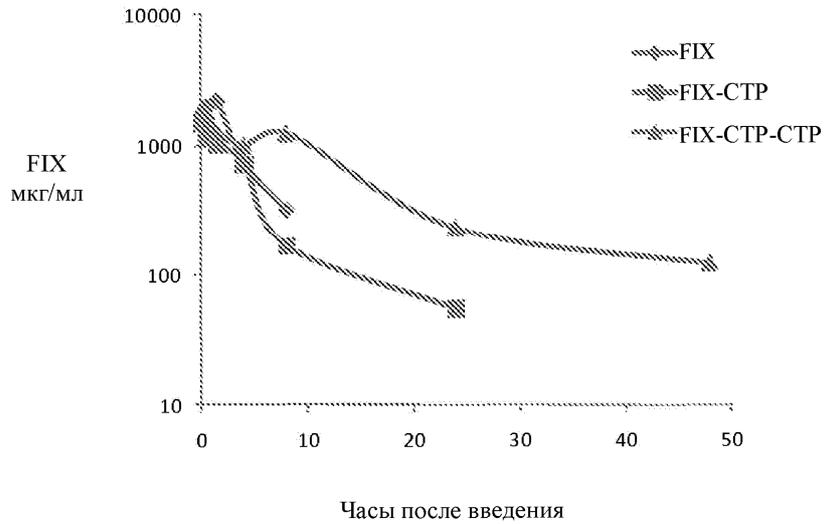
Фиг. 1

Хромогенная активность собранного фактора IX



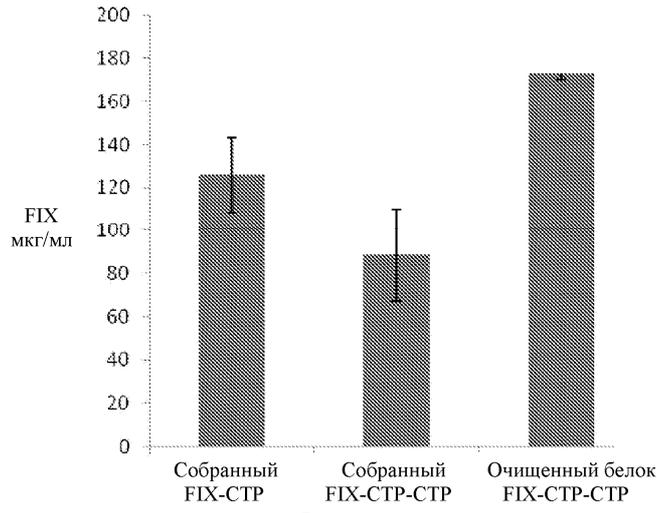
Фиг. 2

**ФК профиль рекомбинантного FIX**

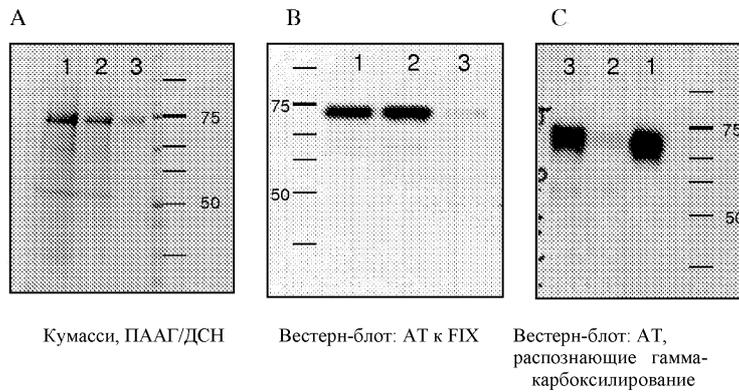


Фиг. 3

**Уровень антигена FIX**



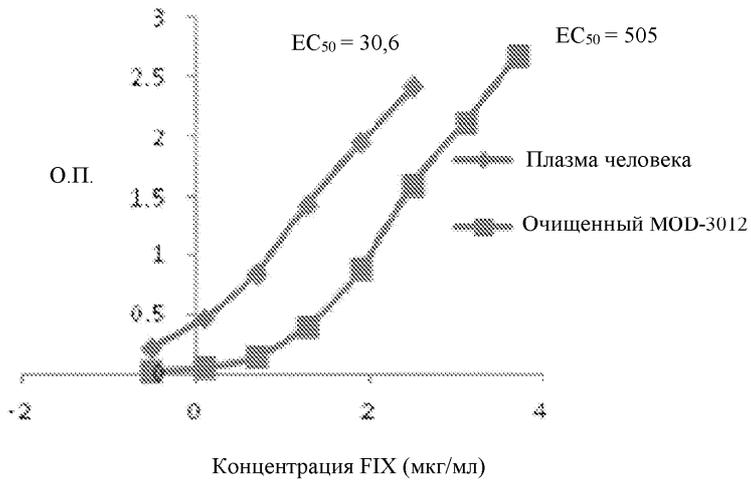
Фиг. 4



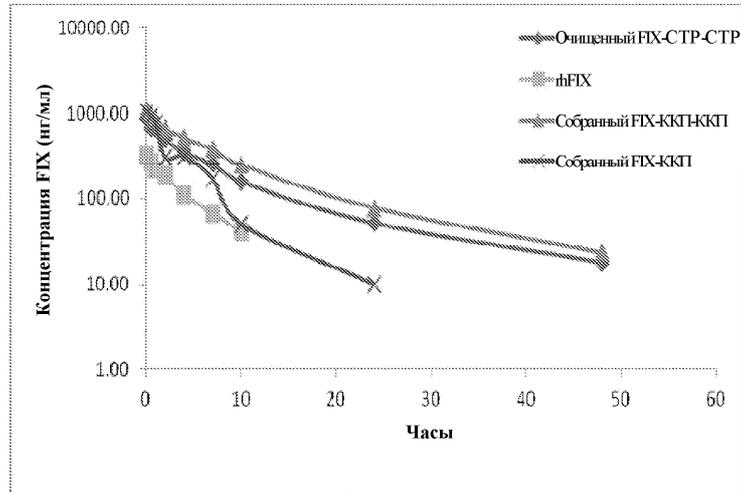
- 1 – Собранный FIX-(СТР)<sub>2</sub>
- 2 - Несвязанный
- 3 – Конц. элюат (MOD3012)

Фиг. 5

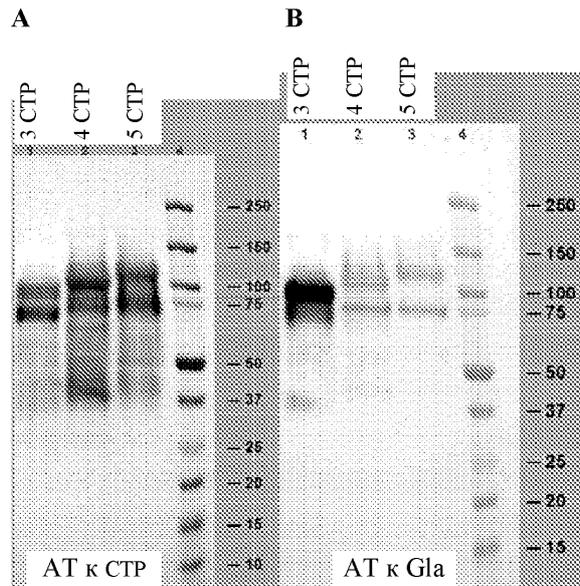
Хромогенная активность фактора IX



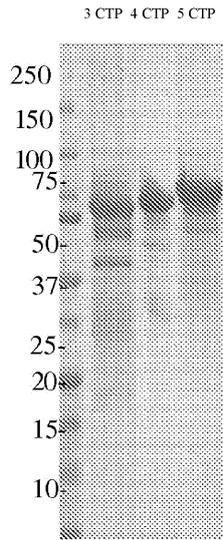
Фиг. 6



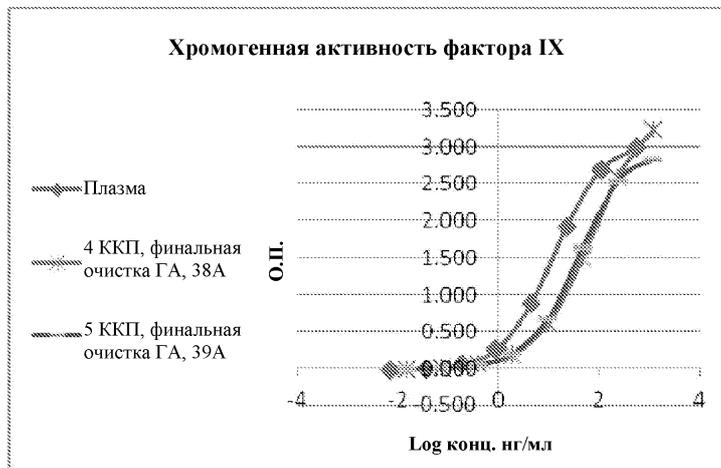
Фиг. 7



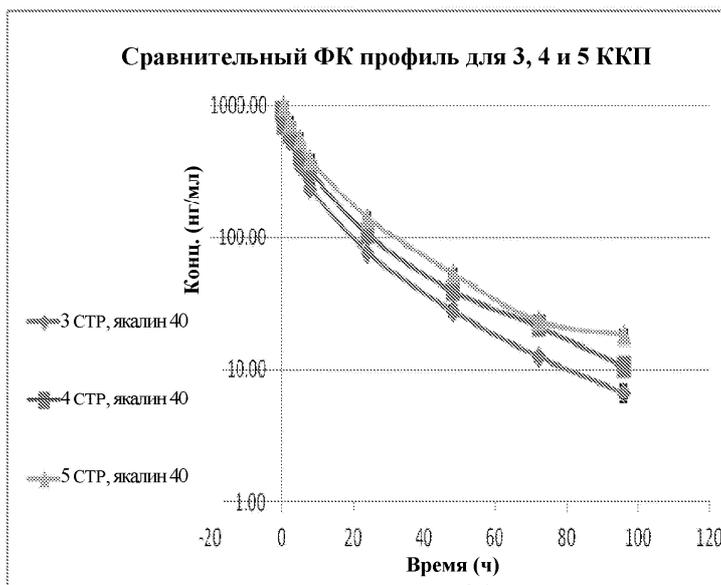
Фиг. 8



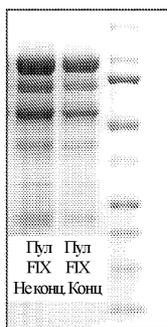
Фиг. 9



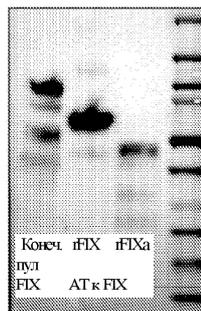
Фиг. 10



Фиг. 11



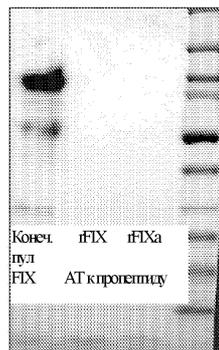
Фигура 12А



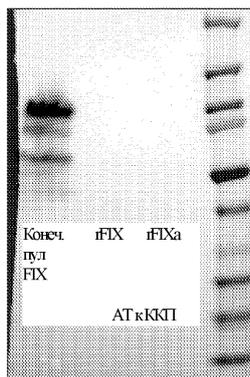
Фигура 12В



Фигура 12С

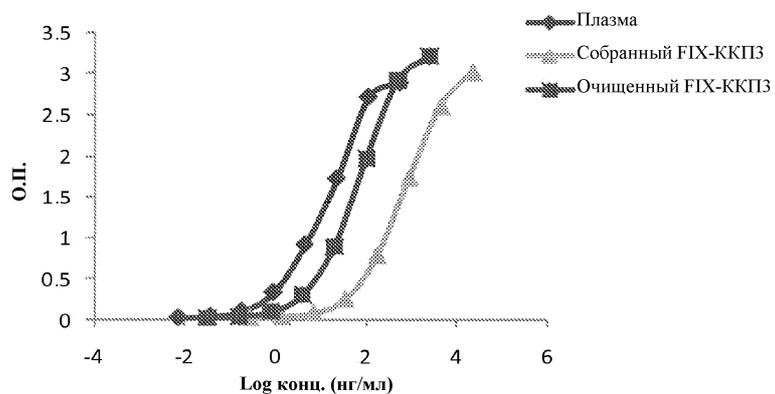


Фигура 12D

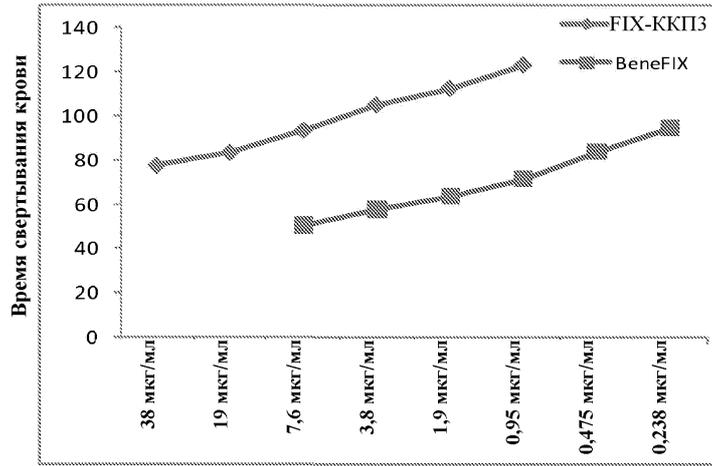


Фигура 12Е

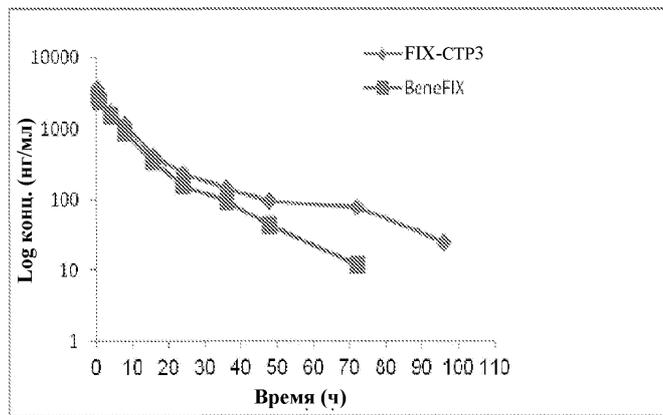
Фиг. 12



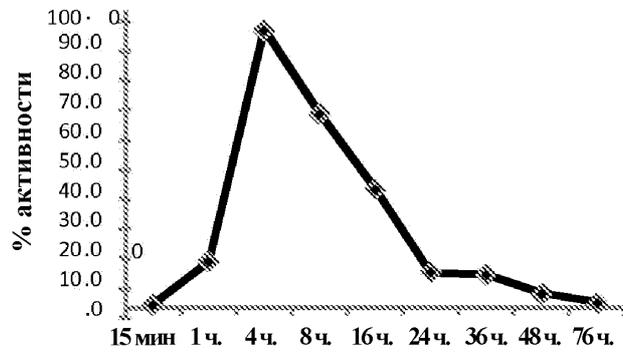
Фиг. 13



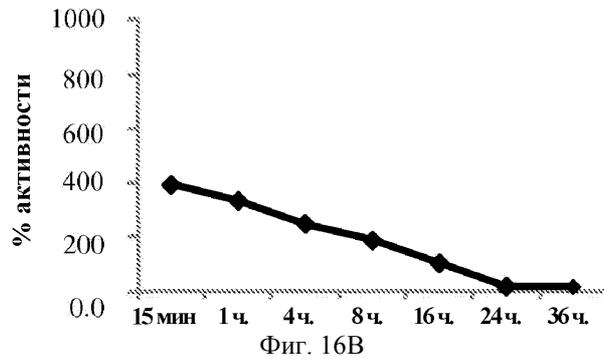
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16А

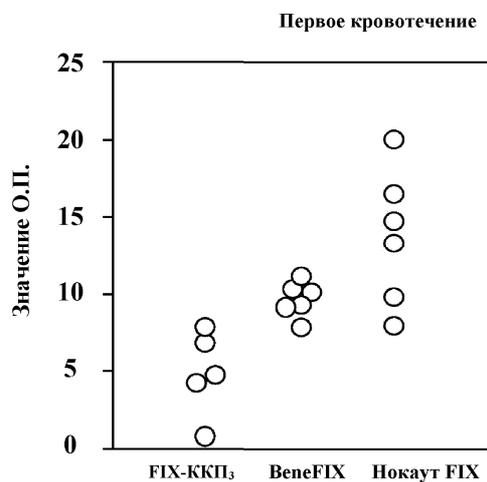


Фиг. 16В

## Первый тест с кровотечением: значение О.П. гемоглобина

№	FIX-СТРЗ	VeneFIX	Нокаут FIX
1	6,84	10,26	19,92
2	0,72	10,14	13,32
3	4,68	11,16	16,38
4	НД	9,18	7,92
5	7,86	7,77	9,72
6	4,14	9,15	14,7

Фиг. 17А

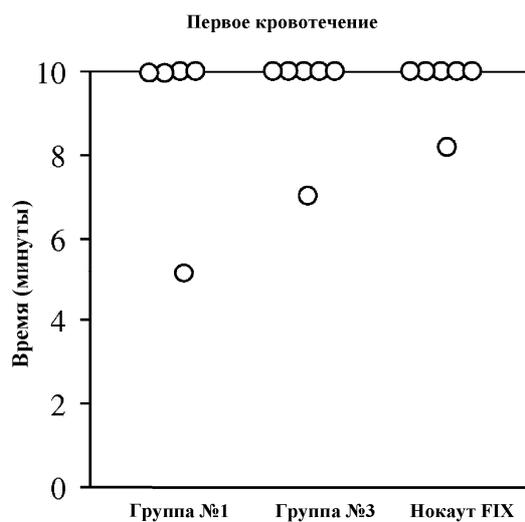


Фиг. 17В

## Время первого кровотечения (мин.)

№	Группа №1	Группа №3	Нокаут FIX
1	10	10	10
2	5,12	10	8,17
3	10	10	10
4		10	10
5	10	7	10
6	10	10	10

Фиг. 17С



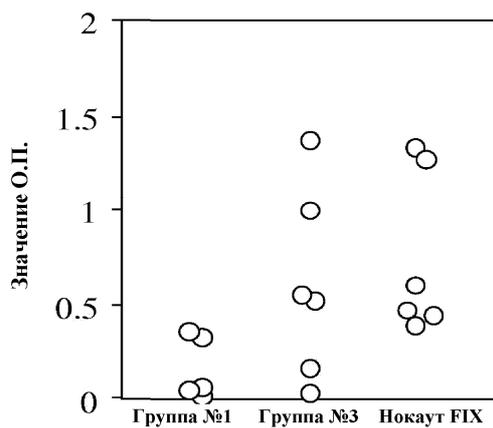
Фиг. 17D

## Второе кровотоечение: значение О.П.

№	FIX-СТРЗ	ВенеFIX	Нокаут FIX
1	0,324	1,368	1,32
2	0,358	0,516	0,43
3	0,006	0,548	0,6
4		0,027	1,26
5	0,064	0,158	0,46
6	0,045	0,992	0,384

Фиг. 18А

## Второе кровотоечение



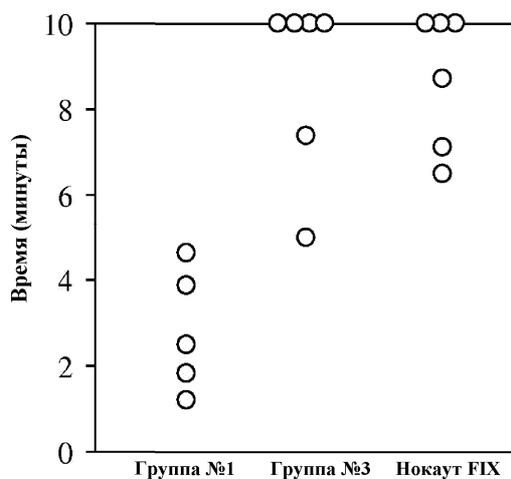
Фиг. 18В

## Время второго кровотоечения (мин.)

№	Группа №1	Группа №3	Нокаут FIX
1	4,63	10	10
2	2,5	10	8,7
3	1,2	10	7,13
4		5	10
5	3,87	7,4	10
6	1,83	10	6,5

Фиг. 18С

## Второе кровотоечение



Фиг. 18D

Фигура 19А



Фигура 19В



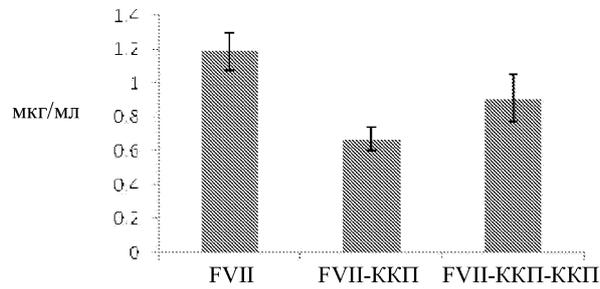
Фигура 19С



Фигура 19D

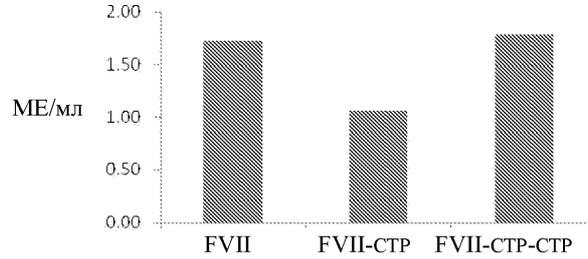
Фиг. 19

Уровень антигена rFVII



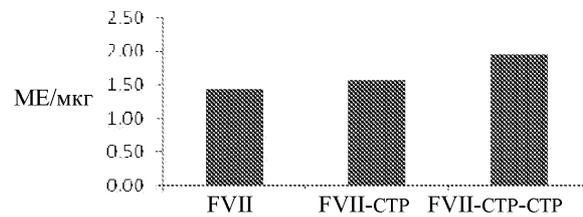
Фиг. 20А

Хромогенная активность rFVII



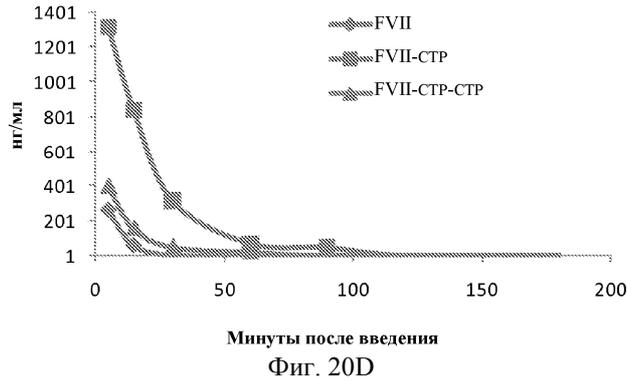
Фиг. 20В

Удельная активность FVII

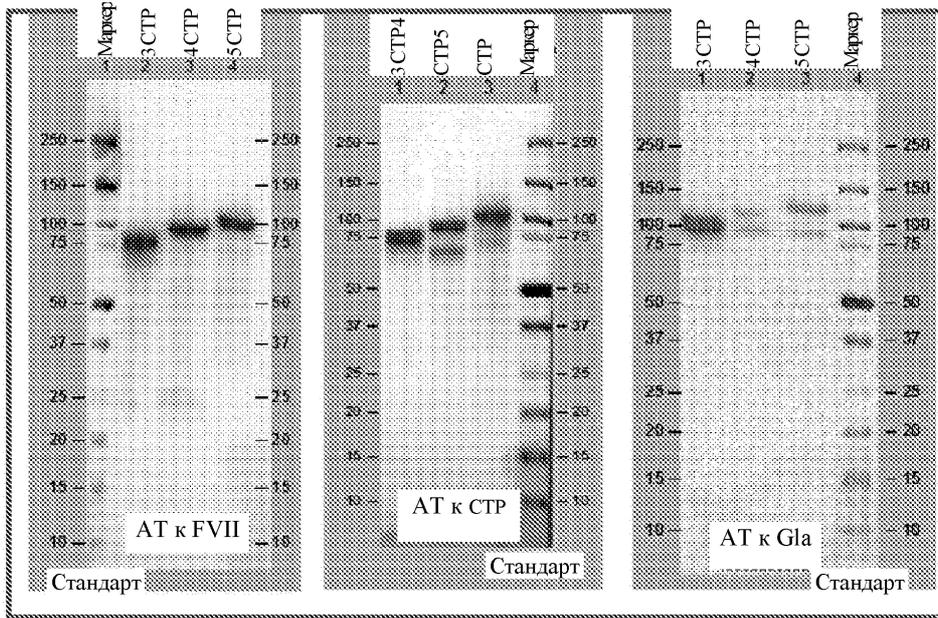


Фиг. 20С

ФК профиль FVII



Минуты после введения  
Фиг. 20D

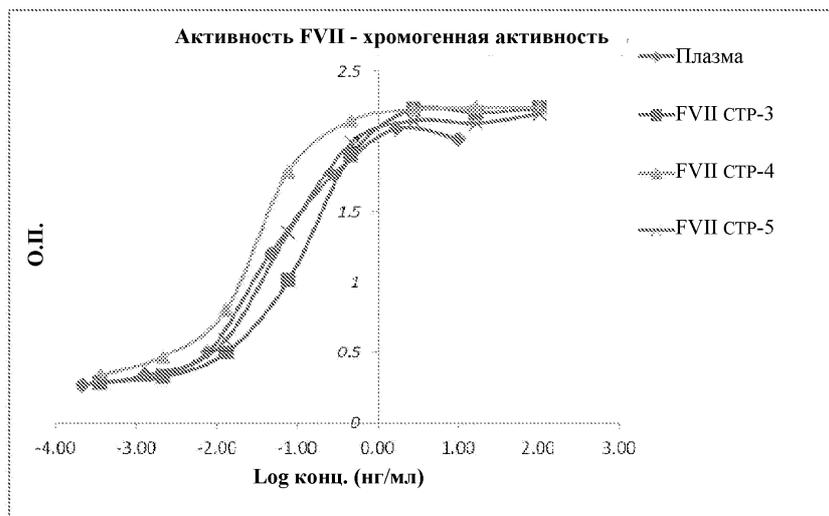


Фигура 21А

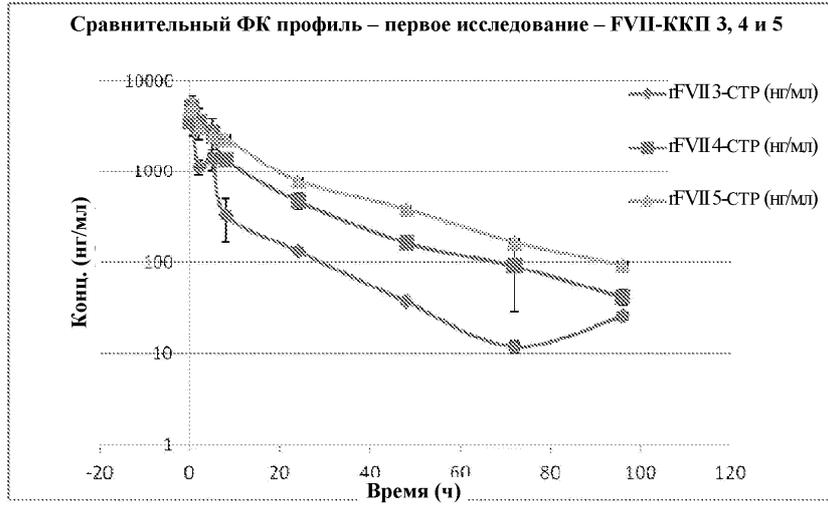
Фигура 21В

Фигура 21С

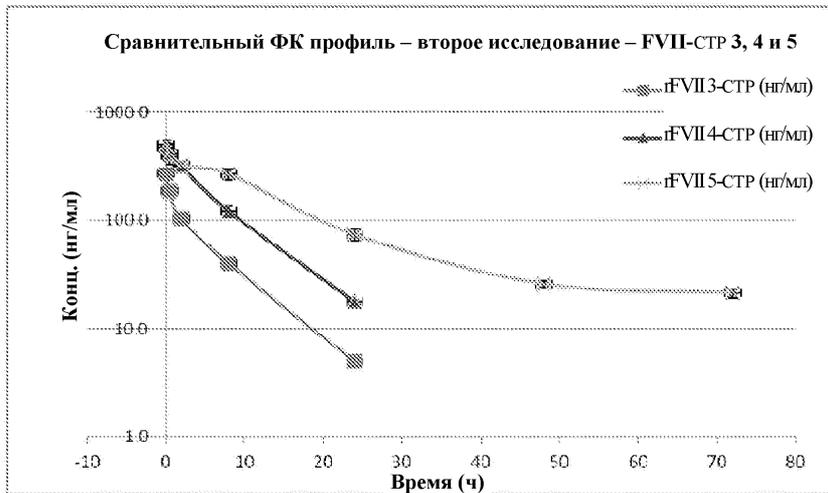
Фиг. 21



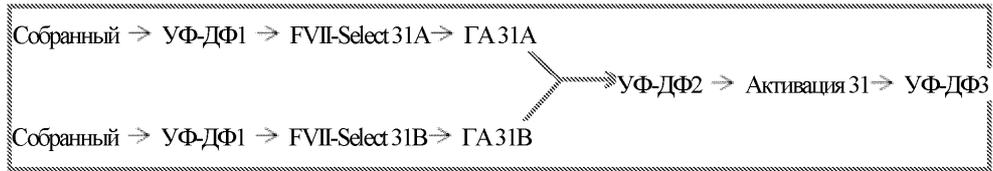
Фиг. 22



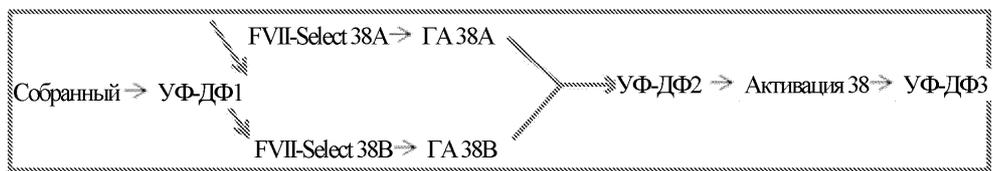
Фиг. 23



Фиг. 24

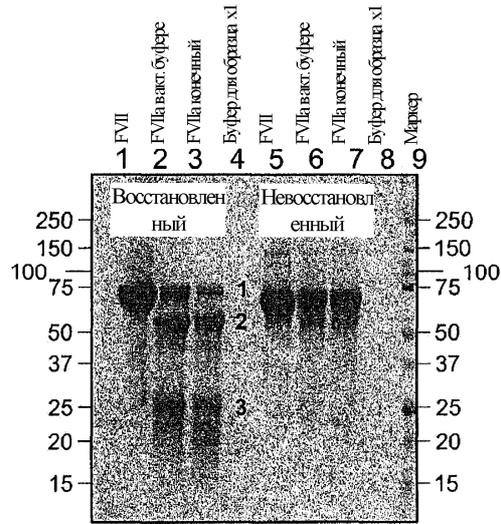


Фиг. 25А



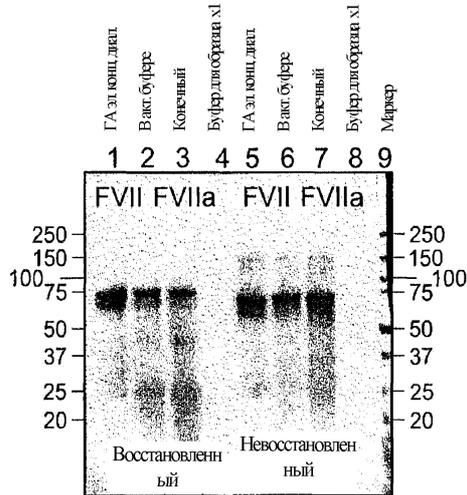
Фиг. 25В

Активация FVII, партия 31



Стандарт

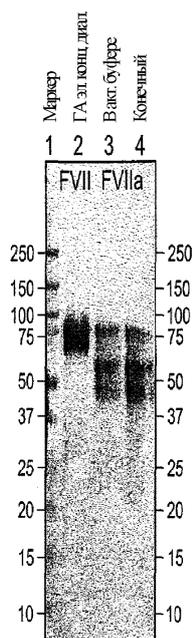
Фиг. 26А



FVII, партия 31, конечные, вестерн-блот с АТ к FVII

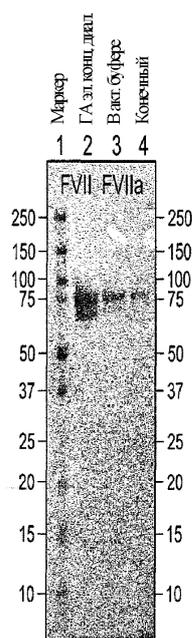
Фиг. 26В

Фигура 26С

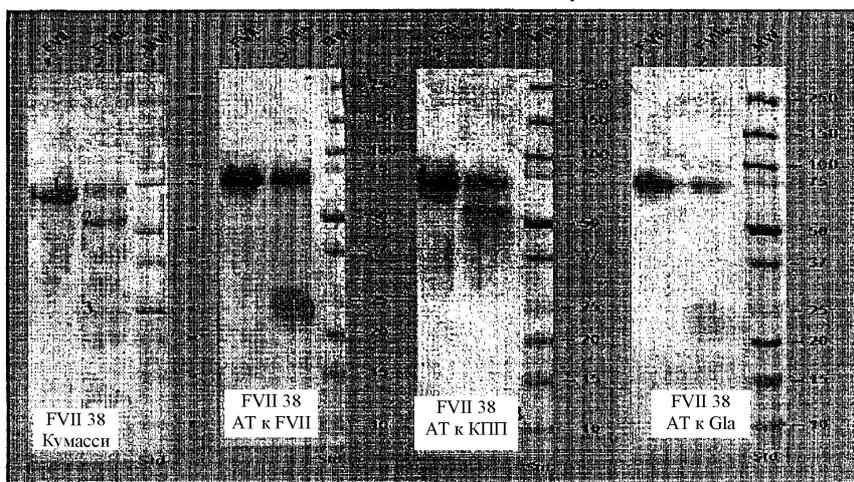


FVII, партия 31, конечные  
Восстановленный  
Вестерн-блот с АТ к СТР

Фигура 26D



FVII, партия 31, конечные  
Восстановленный  
Вестерн-блот с АТ к СТР



Фигура 26Е

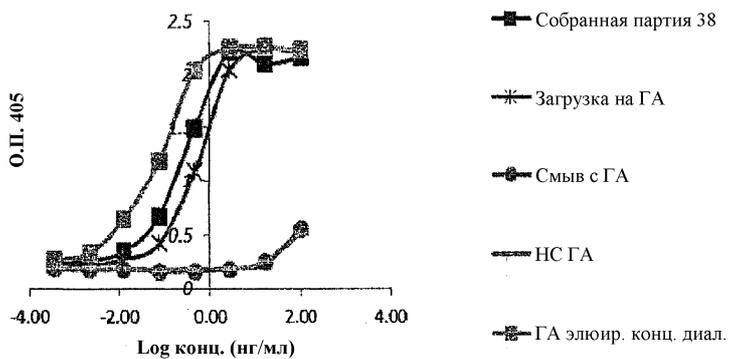
Фигура 26 F

Фигура 26G

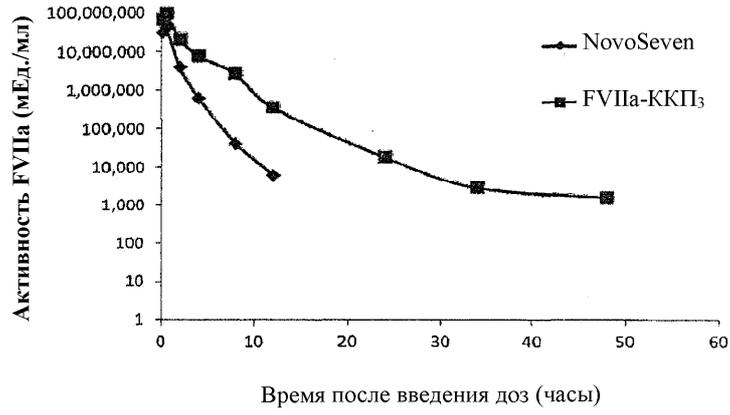
Фигура 26H

Фиг. 26С-Н

Хромогенная активность FVII, партия 38



Фиг. 27



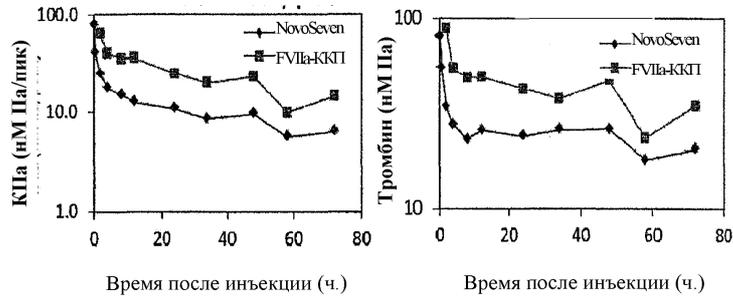
Фиг. 28

Фигура 29А

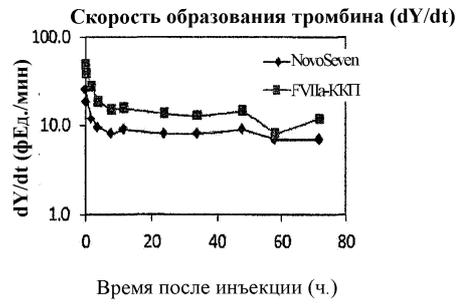
Фигура 29В

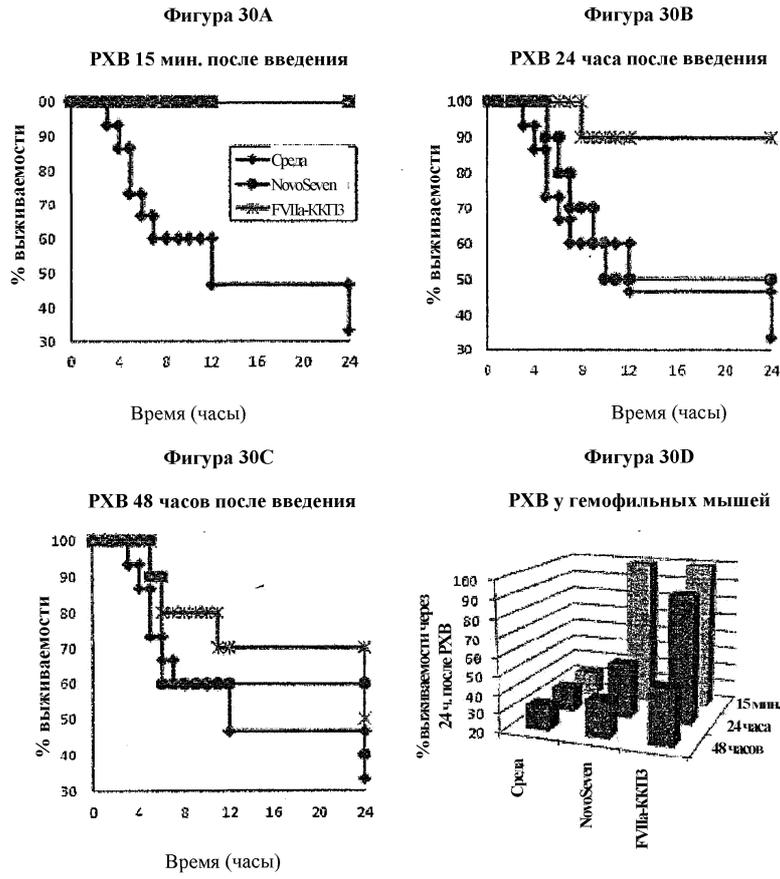
КПА = максимальное количество/пик

Максимальное количество тромбина в каждый момент времени

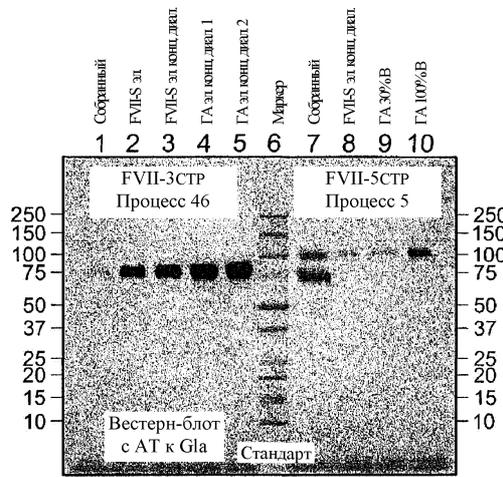


Фиг. 29

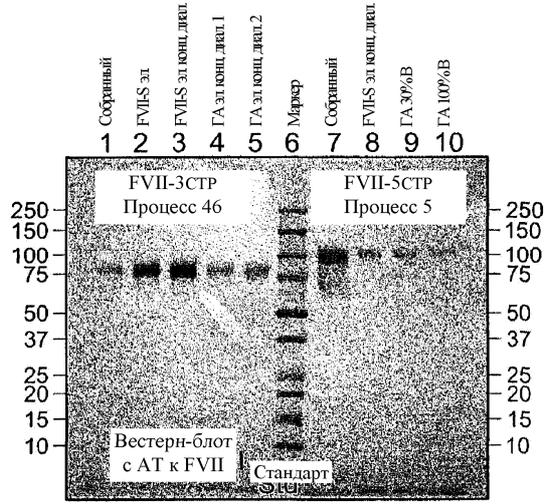




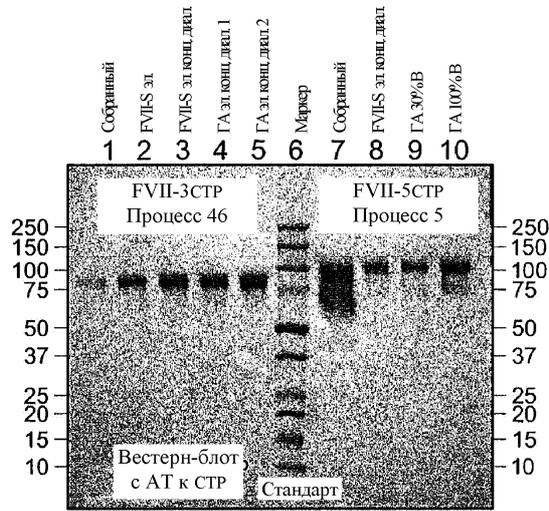
Фиг. 30



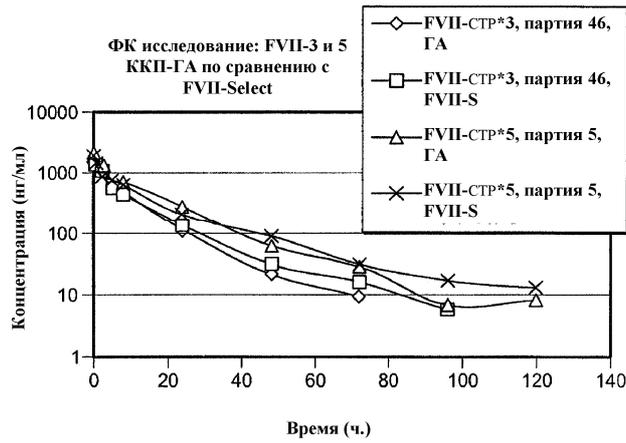
Фиг. 31А



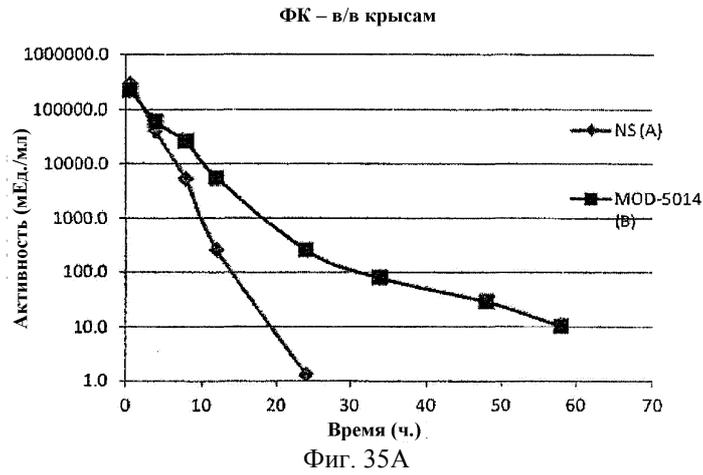
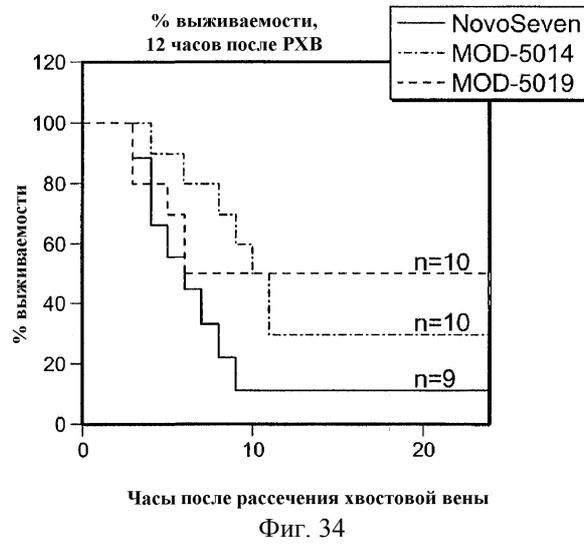
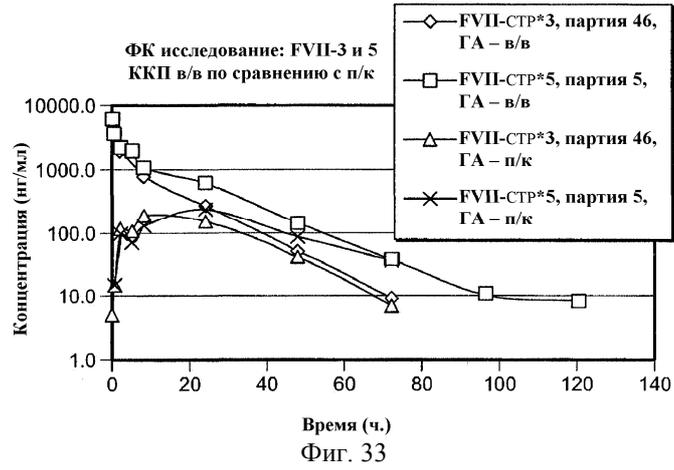
Фиг. 31В

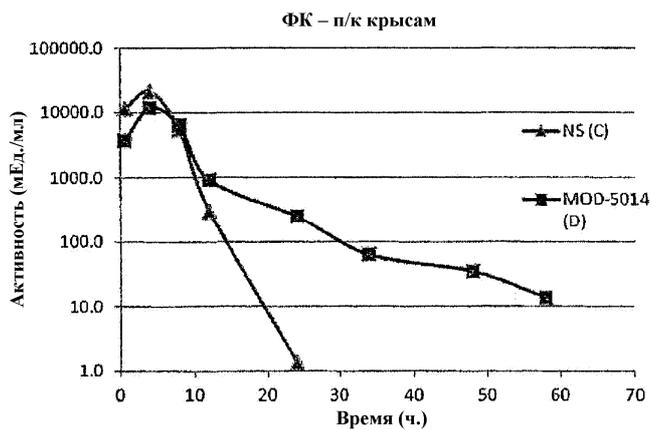


Фиг. 31С

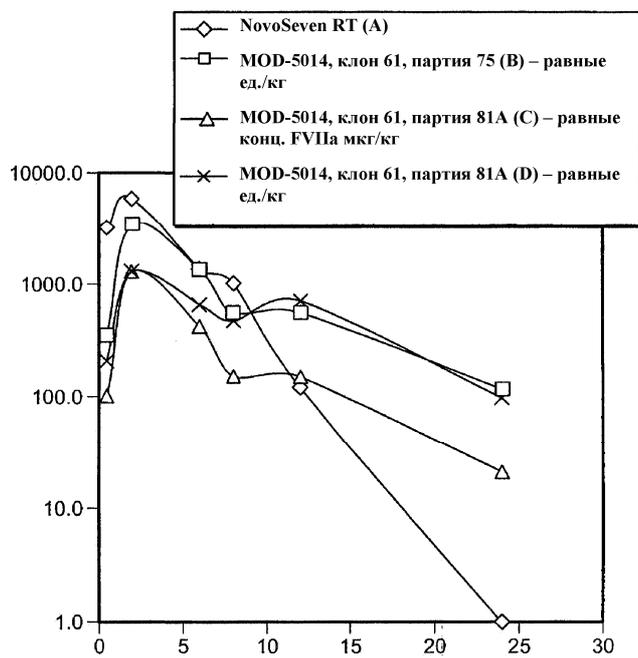


Фиг. 32





Фиг. 35В



Фиг. 36

