

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047451**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.23

(21) Номер заявки
202192140

(22) Дата подачи заявки
2020.01.31

(51) Int. Cl. **A61K 38/36** (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ ФВ (рФВ)

(31) **62/800,370**

(32) **2019.02.01**

(33) **US**

(43) **2021.12.15**

(86) **PCT/US2020/016194**

(87) **WO 2020/160460 2020.08.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
**Мельгорд Бьерн, Эвенштайн Брюс
(US)**

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

(56) US-A1-2012316116

T. ABSHIRE ET AL.: "Prophylaxis escalation in severe von Willebrand disease: a prospective study from the von Willebrand Disease Prophylaxis Network", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 13, no. 9, 14 July 2015 (2015-07-14), pages 1585-1589, XP055697421, GB, ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/jth.12995, abstract

JOAN C GILL ET AL.: "Hemostatic efficacy, safety, and pharmacokinetics of a recombinant von Willebrand factor in severe von Willebrand disease", BLOOD, 22 October 2015 (2015-10-22), XP055697494, DOI: 10.1182/blood-2015-02 - page 2039, right-hand column, paragraph 4, Anonymous: "rVWF IN PROPHYLAXIS - Full Text View - ClinicalTrials.gov", 6 March 2018 (2018-03-06), XP055697509, Retrieved from the Internet: URL:https://clinical trials.gov/ct2/show/NC T02973087 [retrieved on 2020-05-20], abstract

(57) Настоящее изобретение относится к способу профилактического лечения спонтанного кровотечения у субъекта с тяжелой формой болезни фон Виллебранда, включающему введение субъекту терапевтического количества рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ).

B1

047451

047451 B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/800370, поданной 1 февраля 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Нарушения свертывания крови, такие как болезнь фон Виллебранда (БВ), как правило, возникают в результате дефицита в каскаде свертывания крови. Болезнь фон Виллебранда (БВ) относится к группе заболеваний, вызванных дефицитом фактора фон Виллебранда. Фактор фон Виллебранда помогает тромбоцитам слипаться и прилипать к стенке кровеносного сосуда, что необходимо для нормального свертывания крови.

Болезнь фон Виллебранда (БВ) является наиболее распространенным наследственным заболеванием кровотечения, распространенность которого оценивается в 1% (Veyradier A, et al., *Medicine (Baltimore)*. 2016, 95(11):e3038). Однако, исключая более легкие формы заболевания, только около 1/10 000 пациентов действительно нуждаются в лечении. Современное лечение этих коагулопатий включает заместительную терапию с использованием фармацевтических препаратов, содержащих нормальный фактор свертывания крови.

ФВ представляет собой гликопротеин, циркулирующий в плазме в виде серии мультимеров размером от около 500 до 20000 кДа. Клонировали полноразмерную кДНК ФВ; прополипептид соответствует аминокислотным остаткам от 23 до 764 полноразмерного препро-ФВ (Eikenboom et al. (1995) *Haemophilia*, 1, 77-90). Мультимерные формы ФВ состоят из полипептидных субъединиц 250 кДа, связанных вместе дисульфидными связями. ФВ опосредует начальную адгезию тромбоцитов к субэндотелию поврежденной стенки сосуда, при этом более крупные мультимеры проявляют повышенную гемостатическую активность. Мультимеризованный ФВ связывается с гликопротеином Gp1ba на поверхности тромбоцитов посредством взаимодействия в домене А1 ФВ, облегчая адгезию тромбоцитов. Другие участки на ФВ опосредуют связывание со стенкой кровеносного сосуда. Таким образом, ФВ образует мост между тромбоцитами и стенкой сосуда, который необходим для адгезии тромбоцитов и первичного гемостаза в условиях высокого напряжения сдвига. Обычно эндотелиальные клетки секретируют большие полимерные формы ФВ, а те формы ФВ, которые имеют более низкую молекулярную массу, возникают в результате протеолитического расщепления. Мультимеры исключительно больших молекулярных масс хранятся в тельцах Вейбеля-Паллады эндотелиальных клеток и высвобождаются при стимуляции такими агонистами, как тромбин и гистамин.

Для пациентов с БВ рекомендуется проводить лечение с заменой фактора фон Виллебранда (ФВ), учитывая необходимость длительного гемостаза, особенно при крупных хирургических операциях и в ответ на другие эпизоды кровотечения. Однако профилактические способы лечения не описаны и не известны. В данной области техники сохраняется потребность в оказании помощи пациентам заблаговременно до наступления таких эпизодов кровотечения с помощью схем профилактического лечения. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая способы профилактического лечения БВ с помощью человеческого рФВ.

Краткое описание сущности изобретения

В настоящем изобретении представлен способ профилактического лечения эпизодов спонтанного кровотечения у субъекта с тяжелой формой болезни фон Виллебранда (БВ). Способ включает введение субъекту дважды в неделю по меньшей мере одной дозы рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) в диапазоне от по меньшей мере около 40 МЕ/кг до около 80 МЕ/кг, снижая таким образом частоту и/или продолжительность эпизодов спонтанного кровотечения.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна доза рФВ составляет от по меньшей мере около 50 МЕ/кг до около 80 МЕ/кг.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет исходный уровень ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:КР) в диапазоне от 20 МЕ/дл или менее, или у него диагностирована БВ 1-го типа. В определенных вариантах осуществления у субъекта диагностируют БВ типа 2А, 2В или 2М. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет содержание антигена ФВ (ФВ:Аг) в диапазоне от 3 МЕ/дл или выше, или у него диагностирована БВ типа 3.

В некоторых вариантах осуществления субъект получал профилактическое лечение ФВ, полученным из плазмы (пФВ), в течение последних 12 месяцев до первоначального введения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления субъект пережил по меньшей мере 3 эпизода спонтанного кровотечения в течение последних 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления способа введения рФВ выполняют каждые 3-4 дня. В некоторых вариантах осуществления введение выполняют на 1-й день и 5-й день, 2-й день и 6-й день, или 3-й день и 7-й день 7-дневного периода. В некоторых вариантах осуществления введение выполняют по меньшей мере каждые 24 часа, 36 часов, 48 часов, 72 часа или 84 часа. В некоторых вариантах осуществления введения выполняют по меньшей мере каждые 72 часа.

В некоторых вариантах осуществления описанный способ дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одной дозы рекомбинантного фактора VIII (rFVIII). В некоторых вариантах осу-

ществления введение по меньшей мере одной дозы rFVIII выполняют одновременно или последовательно с введением по меньшей мере одной дозы рФВ.

В некоторых вариантах осуществления субъект возобновляет профилактическое лечение после проведения плановой операции или стоматологической операции. В некоторых вариантах осуществления, если плановая операция является малой операцией или стоматологической операцией, а активность FVIII (FVIII:C) у субъекта составляет по меньшей мере 0,4 МЕ/мл или больше, субъекту перед операцией вводят рФВ без rFVIII. В некоторых вариантах осуществления, если плановая операция является большой операцией и у субъекта активность FVIII (FVIII:C) составляет по меньшей мере 0,8 МЕ/мл или более, субъекту перед операцией вводят рФВ без rFVIII.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в снижении на $\geq 25\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактики рФВ по сравнению с ГЧК до лечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в снижении на $\geq 25\%$, $\geq 30\%$, $\geq 35\%$, $\geq 40\%$, $\geq 45\%$, $\geq 50\%$, $\geq 55\%$, $\geq 60\%$, $\geq 65\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$ или $\geq 95\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактики рФВ по сравнению с ГЧК до лечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения измеряют путем оценки активности ФВ:КР и/или FVIII в образцах, полученных от субъекта до и после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения измеряют путем оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ в образцах, полученных от субъекта до и после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 15 минут, 30 минут, 60 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 28 часов, 32 часа, 48 часов, 72 часа или 96 часов после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 25-31 день после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения определяют после или во время эпизода кровотечения, при этом образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают после эпизода кровотечения, и далее образцы получают до введения рФВ, через 2 часа после введения чФВ и затем каждые 12-24 часа до разрешения эпизода кровотечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в повышении уровней активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ после профилактического лечения рФВ по сравнению с уровнями до профилактического лечения рФВ.

Также в данном документе представлен способ профилактического лечения эпизодов спонтанного кровотечения у субъекта с тяжелой формой болезни фон Виллебранда (БВ). Способ включает введение субъекту недельной дозы рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ), по существу эквивалентной соответствующей недельной дозе полученного из плазмы ФВ (пФВ), ранее введенной данному субъекту, снижая таким образом частоту и/или продолжительность эпизодов спонтанного кровотечения.

В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ примерно на 10% меньше, чем соответствующая еженедельная доза пФВ. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ примерно на 10% больше, чем соответствующая еженедельная доза пФВ.

В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ представляет собой две отдельные инфузии, проводимые в отдельные дни. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ представляет собой три отдельные инфузии, проводимые в отдельные дни. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ представляет собой однократную инфузию.

В некоторых вариантах осуществления каждая отдельная инфузия включает до 80 МЕ/кг рФВ.

В некоторых вариантах осуществления каждая отдельная инфузия включает 80 МЕ/кг рФВ.

В некоторых вариантах осуществления каждая отдельная инфузия включает 50 МЕ/кг рФВ.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет исходный уровень ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:КР) в диапазоне от 20 МЕ/дл или менее, или у него диагностирована БВ 1-го типа. В определенных вариантах осуществления у субъекта диагностируют БВ типа 2А, 2В или 2М. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет содержание антигена ФВ (ФВ:Аг) в диапазоне от 3 МЕ/дл и выше, или у него диагностирована БВ типа 3.

В некоторых вариантах осуществления субъект получал профилактическое лечение пФВ в течение по меньшей мере 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления две отдельные инфузии вводят на 1-й день и 5-й день, или 2-

й день и 6-й день, или 3-й день и 7-й день из 7-дневного периода. В определенных вариантах осуществления три отдельные инфузии вводят на 1-й день, 3-й день и 6-й день из 7-дневного периода. В некоторых вариантах осуществления введение выполняют по меньшей мере каждые 24 часа, 36 часов, 48 часов, 72 часа или 84 часа. В конкретных вариантах осуществления введение выполняют по меньшей мере каждые 72 часа.

В некоторых вариантах осуществления представленный в данном документе способ дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одной дозы рекомбинантного фактора VIII (rFVIII).

В некоторых вариантах осуществления введение по меньшей мере одной дозы rFVIII выполняют одновременно или последовательно с введением недельной дозы рФВ.

В некоторых вариантах осуществления субъект возобновляет профилактическое лечение после проведения плановой операции или стоматологической операции. В некоторых вариантах осуществления, если плановая операция является малой операцией или стоматологической операцией, а активность FVIII (FVIII:C) у субъекта составляет по меньшей мере 0,4 МЕ/мл или больше, субъекту вводят рФВ без rFVIII до операции. В некоторых вариантах осуществления, если плановая операция является большой операцией и у субъекта активность FVIII (FVIII:C) составляет по меньшей мере 0,8 МЕ/мл или более, субъекту вводят рФВ без rFVIII до операции.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в снижении на $\geq 25\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактики рФВ по сравнению с ГЧК до лечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в снижении на $\geq 25\%$, $\geq 30\%$, $\geq 35\%$, $\geq 40\%$, $\geq 45\%$, $\geq 50\%$, $\geq 55\%$, $\geq 60\%$, $\geq 65\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$ или $\geq 95\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактики рФВ по сравнению с ГЧК до лечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения измеряют путем оценки активности ФВ:КР и/или FVIII в образцах, полученных от субъекта до и после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения измеряют путем оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ в образцах, полученных от субъекта до и после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 15 минут, 30 минут, 60 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 28 часов, 32 часа, 48 часов, 72 часа или 96 часов после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 25-31 день после профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения определяют после или во время эпизода кровотечения, при этом образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают после эпизода кровотечения, и далее образцы получают до введения рФВ, через 2 часа после введения чФВ и затем каждые 12-24 часа до разрешения эпизода кровотечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в повышении уровня активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ после профилактического лечения рФВ по сравнению с уровнями до профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления спонтанное кровотечение или эпизод кровотечения включает любой эпизод, выбранный из группы, состоящей из гемартроза, носового кровотечения, кровотечения из мышц, кровотечения из полости рта и кровотечения из желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных способов у субъекта не диагностируют БВ типа 2N или псевдо БВ.

Другие цели, преимущества и варианты осуществления изобретения будут очевидны из нижеследующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан дизайн исследования для глобального, многоцентрового, открытого исследования фазы 3 (NCT02973087, EudraCT №: 2016-001478-14), описанный в данном документе.

На фиг. 2 приведена таблица основных критериев включения и невключения в исследование.

На фиг. 3 приведена таблица иллюстративных схем дозирования для профилактики рФВ.

На фиг. 4 приведена таблица основных критериев эффективности в исследовании.

На фиг. 5А-5С изображена последовательность нуклеиновых кислот человеческого рекомбинантного препро-ФВ.

На фиг. 6А-6J изображена аминокислотная последовательность человеческого рекомбинантного препро-ФВ.

На фиг. 7A-7G изображена аминокислотная последовательность человеческого рекомбинантного зрелого ФВ.

Подробное описание сущности изобретения

Введение.

Для пациентов с БВ рекомендуется проводить лечение с заменой фактора фон Виллебранда (ФВ), учитывая необходимость длительного гемостаза, особенно при большой операции (Mannucci PM and Franchini M., *Haemophilia*, 2017, 23(2):182-187; National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Disease NIH Publication No. 08-5832; December, 2007). Средства для лечения на основе ФВ, получаемые из плазмы крови, содержат фактор VIII (FVIII) и имеют потенциал для накопления FVIII при многократном дозировании.

VONVENDI®, одобренный для США, и его аналог, одобренный для ЕС, VEYVONDI®, покрывают концентраты рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ), которые производятся по технологии рекомбинантной ДНК в линии клеток яичника китайского хомячка без добавления экзогенного белка человеческого или животного происхождения (Turecek PL, et al. *Hämostaseologie*. 2009; 29(suppl 1):S32-38; Mannucci PM, et al. *Blood*, 2013;122(5):648-657; Gill JC, et al. *Blood*, 2015;126(17):2038-2046; European Medicines Agency. VEYVONDI Summary of Product Characteristics). рФВ содержит полный профиль мультимеров ФВ, включая сверхкрупные мультимеры, которых обычно не хватает в концентратах ФВ, полученных из плазмы (пФВ), подвергнутых воздействию ADAMTS13, белка, расщепляющего ФВ.

У большинства пациентов с БВ наблюдаются легкие или умеренные кровотечения из слизистых оболочек и кровотечения после травм или операций, хотя могут возникать и угрожающие жизни кровотечения, особенно у пациентов с тяжелой формой заболевания (Nichols et al., *Haemophilia*, 2008, 14:171-232; Leebeek FW и Eikenboom JC, *N Engl J Med*, 2016, 375:2067-80). Ожидается, что снижение частоты и продолжительности эпизодов кровотечения уменьшит потребность в переливании эритроцитов и снизит риск развития изнурительных сопутствующих заболеваний, включая артропатию.

Пациентам с тяжелой формой БВ может быть полезно профилактическое лечение рФВ для поддержания уровня ФВ и FVIII, чтобы снизить риск эпизодов спонтанного кровотечения (ЭК), включая гемартроз, эпистаксис и кровотечения из желудочно-кишечного тракта (Abshire TC, *Thromb Res* 2009, 124(suppl 1):S23-6; Berntorp E, *Haemophilia* 2008, 14(suppl 5):47-53; Berntorp E and Petrini P, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2005, 16 (suppl 1): S23-6; Berntorp E, *Semin Thromb Hemost*, 2006, 32:621-5; Abshire et al., *Haemophilia*, 2013, 19:76-81; Abshire TC, *J Thromb Haemost*, 2015, 13:1585-9).

В настоящем изобретении представлены способы профилактического лечения спонтанных кровотечений у пациента с тяжелой формой болезни фон Виллебранда (БВ). Способ включает введение субъекту рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ). В некоторых вариантах осуществления субъекту дважды в неделю вводят дозу рФВ в пределах 40-80 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают недельную дозу рФВ в диапазоне 40-80 МЕ/кг. В некоторых случаях недельная доза предоставляется в виде однократного введения один раз в неделю. В некоторых случаях недельная доза предоставляется в виде двух отдельных введений в разные дни в течение недели. В других случаях недельная доза предоставляется в виде трех отдельных введений в разные дни в течение недели.

Раскрытие публикации заявки РСТ № WO2012/171031 включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Определения.

Перед тем как данное изобретение описано далее, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку таковые могут, конечно, варьировать. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

В контексте данного документа термин "рФВ" относится к рекомбинантному ФВ.

В контексте данного документа термин "rFVIII" относится к рекомбинантному FVIII.

Термин "Рекомбинантный" при использовании со ссылкой, например, на клетку или нуклеиновую кислоту, белок или вектор, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы введением гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или изменением нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые иначе экспрессируются аномально, недостаточно экспрессируются или не экспрессируются вообще.

В контексте данного документа термин "рекомбинантный ФВ" включает ФВ, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В определенных вариантах осуществления белка ФВ могут включать конструкцию, например, полученную, как в WO 1986/06096, опубликованной 23 октября 1986 г., и заявке на патент США № 07/559509, поданной 23 июля 1990 г., на имя Ginsburg et al., которая включена в данный документ посредством ссылки в отношении способов получения рекомбинантного ФВ. ФВ в данном изобретении может включать все потенциальные формы, включая мономерные и

мультимерные формы. Также следует понимать, что данное изобретение охватывает различные формы ФВ, которые можно использовать в комбинации. Например, ФВ по данному изобретению может включать различные мультимеры, разные производные, а также как биологически активные производные, так и производные, не являющиеся биологически активными.

В контексте настоящего изобретения рекомбинантный ФВ охватывает любого члена семейства ФВ от, например, млекопитающего, такого как примат, человек, обезьяна, кролик, свинья, грызун, мышь, крыса, хомяк, песчанка, собака, кошка и их биологически активные производные. Также охватываются мутантные и варианты белки ФВ, обладающие активностью, а также функциональные фрагменты и слитые белки на основе белков ФВ. Кроме того, ФВ по изобретению может дополнительно содержать метки, которые облегчают очистку, обнаружение или и то, и другое. Описанный в данном документе ФВ может быть дополнительно модифицирован терапевтическим фрагментом или фрагментом, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

В контексте данного документа "ФВ, полученный из плазмы" или "ФВ" включает все формы белка, содержащиеся в крови, включая зрелый ФВ, полученный от млекопитающего, обладающий свойством стабилизации *in vivo*, например, связывание по меньшей мере одной молекулы FVIII.

Термин "высокомультимерный ФВ" или "высокомолекулярный ФВ" относится к ФВ, содержащему по меньшей мере 10 субъединиц, или 12, 14 или 16 субъединиц, до около 20, 22, 24 или 26 субъединиц или более. Термин "субъединица" относится к мономеру ФВ. Как известно в данной области техники, обычно димеры ФВ полимеризуются с образованием мультимеров более высокого порядка (см., например, Turecek et al., *Semin. Thromb. Hemost.* 2010, 36(5): 510-521, который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех идей, касающихся анализа мультимеров ФВ).

В контексте данного документа термин "фактор VIII" или "FVIII" относится к любой форме молекулы фактора VIII с иллюстративными характеристиками фактора свертывания крови VIII, независимо от того, является ли она эндогенной для пациента, получена из плазмы крови или получена с помощью методов рекомбинантной ДНК, и включая все модифицированные формы фактора VIII. Фактор VIII (FVIII) существует в природе и в терапевтических препаратах в виде гетерогенного распределения полипептидов, происходящих из одного генного продукта (см., например, Andersson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2979-2983 (1986)). Коммерчески доступные примеры терапевтических препаратов, содержащих фактор VIII, включают препараты, продаваемые под торговыми названиями HEMOFIL M, ADVATE и RECOMBINATE (доступны от Baxter Healthcare Corporation, Дирфилд, штат Иллинойс, США).

В контексте данного документа термины "активность FVIII в плазме" и "активность FVIII *in vivo*" используются взаимозаменяемо. Активность FVIII *in vivo*, измеренная с помощью стандартных анализов, может быть эндогенной активностью FVIII, активностью введенного в терапевтических целях FVIII (рекомбинантного или полученного из плазмы) или активностью как эндогенного, так и введенного FVIII. Аналогично, "FVIII в плазме" относится к эндогенному FVIII или вводимому рекомбинантному или полученному из плазмы FVIII.

В контексте данного документа "болезнь фон Виллебранда" относится к группе заболеваний, вызванных дефицитом фактора фон Виллебранда. Фактор фон Виллебранда помогает тромбоцитам слипаться и прилипать к стенке кровеносного сосуда, что необходимо для нормального свертывания крови. Как более подробно описано в данном документе, существует несколько типов болезни фон Виллебранда, включая тип 1, 2A, 2B, 2M и 3.

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к материалу, в основном или по существу не содержит компонентов, которые обычно сопровождают его, находясь в нативном состоянии. Чистота и однородность обычно определяются с использованием методов аналитической химии, например, электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. ФВ является преобладающим видом, присутствующим в препарате, который по существу является очищенным. Термин "очищенный" в некоторых вариантах осуществления означает, что нуклеиновая кислота или белок дает по существу одну полосу в электрофоретическом геле. В других вариантах осуществления это означает, что нуклеиновая кислота или белок имеют чистоту по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. "Очистить" или "очистка" в других вариантах осуществления означает удаление по меньшей мере одного загрязняющего вещества из очищаемой композиции. В этом смысле для очистки не требуется, чтобы очищенное соединение было гомогенным, например, 100% чистым.

В контексте данного документа термин "введение" (и все грамматические эквиваленты) включает внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, пероральное введение, введение в виде суппозитория, местный контакт, внутрибрюшинное, внутриочаговое или интраназальное введение, или имплантацию субъекту устройства с медленным высвобождением, например, осмотического мининасоса. Введение осуществляют любым способом, включая парентеральный и трансмукозальный (например, пероральный, назальный, вагинальный, ректальный или трансдермальный). Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриаартериальное, внутрикожное,

подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутривенное и внутримышечное введение. Другие способы доставки включают, но не ограничиваются ими, использование липосомальных составов, внутривенную инфузию, трансдермальные пластыри и т.д.

Термины "терапевтически эффективное количество или доза" или "терапевтически достаточное количество или доза", или "эффективное или достаточное количество или доза" относятся к дозе, которая вызывает терапевтические эффекты, для которых ее вводят. Например, терапевтически эффективное количество лекарственного средства, полезного для лечения гемофилии, может представлять собой количество, которое способно предотвратить или облегчить один или более симптомов, связанных с гемофилией. Точная доза будет зависеть от цели лечения и устанавливаться специалистом с использованием известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

В контексте данного документа термины "пациент" и "субъект" используются как взаимозаменяемые и означают млекопитающее (предпочтительно человека), которое имеет заболевание или потенциально может заболеть.

Используемый в данном документе термин "около" означает приблизительный диапазон плюс или минус 10% от указанного значения. Например, формулировка "около 20%" охватывает диапазон 18-22%.

В контексте данного документа термин "период полужизни" относится к периоду времени, который требуется для того, чтобы количество вещества, подвергающегося деградации (или выведению из образца или из пациента), уменьшилось наполовину.

Рекомбинантный фактор фон Виллебранда (рФВ).

В настоящем изобретении используются композиции, содержащие фактор фон Виллебранда (рФВ), для профилактического лечения эпизодов спонтанного кровотечения у субъекта с тяжелой формой БФ. В некоторых вариантах осуществления лечение уменьшает степень тяжести, частоту возникновения (частоту) и/или продолжительность эпизодов спонтанного кровотечения.

В определенных вариантах осуществления белки ФВ могут включать конструкцию, например, полученную, как в WO 1986/06096, опубликованной 23 октября 1986, и заявке на патент США № 07/559509, поданной 23 июля, 1990, на имя Ginsburg et al., которая включена в данный документ посредством ссылки в отношении способов получения рекомбинантного ФВ. ФВ, полезный для настоящего изобретения, включает все потенциальные формы, включая мономерные и мультимерные формы. Одной из особенно полезных форм ФВ являются гомомультимеры по меньшей мере двух ФВ. Белки ФВ могут быть либо биологически активными производными, либо, если они используются исключительно в качестве стабилизатора для FVIII, ФВ может быть в форме, не обладающей биологической активностью. Также следует понимать, что данное изобретение охватывает различные формы ФВ, которые можно использовать в комбинации. Например, композиция, полезная для настоящего изобретения, может содержать различные мультимеры, разные производные, а также как биологически активные производные, так и производные, не являющиеся биологически активными.

При первичном гемостазе ФВ служит мостом между тромбоцитами и определенными компонентами внеклеточного матрикса, такими как коллаген. Биологическая активность ФВ в этом процессе может быть измерена с помощью различных анализов *in vitro* (Turecek et al., *Semin. Thromb. Hemost.* 28: 149-160, 2002). Анализ кофактора ристоцетина основан на агрегации свежих или фиксированных формалином тромбоцитов, индуцированной антибиотиком ристоцетином в присутствии ФВ.

Степень агрегации тромбоцитов зависит от концентрации ФВ и может быть измерена турбидиметрическим методом, например, с помощью агрегометра (Weiss et al., *J. Clin. Invest.* 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane et al., *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34: 306-308, 1975). Вторым способом представляет собой анализ связывания коллагена, основанный на технологии ИФА (Brown et Bosak, *Thromb. Res.* 43: 303-311, 1986; Favalo, *Thromb. Haemost.* 83: 127-135, 2000). Планшет для микротитрования покрывают коллагеном I или III типа. Затем ФВ связывают с коллагеновой поверхностью и впоследствии детектируют при помощи поликлонального антитела, меченого ферментом. Последняя стадия представляет собой реакцию с субстратом, которую можно фотометрически фиксировать с помощью считывающего устройства ИФА. Как предусмотрено в данном документе, специфическая ристоцетин-кофакторная активность ФВ (ФВ:КР) по настоящему изобретению обычно описывается в единицах мЕ/мкг ФВ, как измерено с использованием анализов *in vitro*.

Преимущество композиций рФВ по настоящему изобретению перед пФВ заключается в том, что рФВ обладает более высокой удельной активностью, чем пФВ. В некоторых вариантах осуществления рФВ имеет удельную активность по меньшей мере около 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 или более мЕд/мкг.

рФВ по настоящему изобретению является в высокой степени мультимерным, содержащим от около 10 до около 40 субъединиц. В дополнительных вариантах осуществления мультимерный рФВ, полученный с использованием способов по данному изобретению, содержит около 10-30, 12-28, 14-26, 16-24,

18-22, 20-21 субъединиц. В дополнительных вариантах осуществления рФВ присутствует в мультимерах, размер которых варьирует от димеров до мультимеров, содержащих более 40 субъединиц (>10 миллионов дальтон). Самые большие мультимеры обеспечивают множественные участки связывания, которые могут взаимодействовать как с рецепторами тромбоцитов, так и с участками повреждения субэндотелиального матрикса, и являются наиболее гемостатически активной формой ФВ. Применение ADAMTS13 со временем расщепляет сверхкрупные мультимеры рФВ, но во время производства (как правило, путем экспрессии в культуре клеток) композиции рФВ по настоящему изобретению, как правило, не подвергаются воздействию ADAMTS13 и сохраняют свою высокомультимерную структуру.

В одном варианте осуществления композиция рФВ, используемая в описанных в данном документе способах, имеет распределение олигомеров рФВ, характеризующееся тем, что 95% олигомеров имеют от 6 субъединиц до 20 субъединиц. В других вариантах осуществления композиция рФВ имеет распределение олигомеров рФВ, характеризующееся тем, что 95% олигомеров имеют диапазон субъединиц, выбранных из вариантов 458-641, приведенных в табл. 2 WO 2012/171031, которая включена в данный документ путем ссылки во всей своей полноте для всех целей.

В одном варианте осуществления композиции рФВ может быть охарактеризована в соответствии с процентным содержанием молекул рФВ, которые присутствуют в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере. Например, в одном варианте осуществления по меньшей мере 20% молекул рФВ в композиции рФВ, используемой в способах, описанных в данном документе, присутствуют в олигомерном комплексе, состоящем из по меньшей мере 10 субъединиц. В другом варианте осуществления по меньшей мере 20% молекул рФВ в композиции рФВ, используемой в способах, описанных в данном документе, присутствуют в олигомерном комплексе, состоящем из по меньшей мере 12 субъединиц. В других вариантах осуществления композиция рФВ, используемая в способах, предложенных в данном документе, имеет минимальный процент (например, имеет по меньшей мере X %) молекул рФВ, присутствующих в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере (например, мультимере из по меньшей мере Y субъединиц) согласно любому из вариантов 134-457, приведенных в табл. 3-5, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

В соответствии с вышеизложенным, композиция рФВ, вводимая субъекту (с или без FVIII), как правило, включает значительный процент высокомолекулярных (ВМ) мультимеров рФВ. В дополнительных вариантах осуществления композиция ВМ мультимеров рФВ содержит по меньшей мере 10-80% декамеров рФВ или мультимеров более высокого порядка. В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит около 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% декамеров или мультимеров более высокого порядка. В дополнительных вариантах осуществления композиция ВМ мультимеров рФВ содержит по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% декамеров или мультимеров более высокого порядка.

Оценка количества и процентного содержания мультимеров рФВ может быть проведена с использованием методов, известных в данной области техники, включая, без ограничения, методы с использованием электрофореза и методы эксклюзионной хроматографии для разделения мультимеров ФВ по размеру, например, как обсуждается в Cumming et al., (J Clin Pathol., 1993 May; 46(5): 470-473, который включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех рекомендаций, относящихся к оценке мультимеров ФВ). Такие методы могут дополнительно включать методы иммуноблоттинга (такие как вестерн-блоттинг), при которых гель подвергают иммуноблоттингу с помощью радиоактивно меченного антитела к ФВ с последующим хемилюминесцентным обнаружением (см. например Wen et al., (1993), J. Clin. Lab. Anal., 7: 317-323, который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, относящихся к оценке мультимеров ФВ). Дополнительные анализы на ФВ включают анализ активности антигена ФВ (ФВ:Аг), ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:КР) и анализ коллагенсвязывающей активности ФВ (ФВ:КСА), которые часто используются для диагностики и классификации болезни фон Виллебранда (см., например, Favaloro et al., Pathology, 1997, 29(4): 341-456, который настоящим включен посредством ссылки в полном объеме для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с анализами на ФВ).

В дополнительных вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка по данному изобретению стабильны в течение от около 1 до около 90 часов после введения. В других вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка стабильны в течение около 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 часов после введения. В других вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка стабильны в течение по меньшей мере 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления оценивается стабильность мультимеров рФВ *in vitro*.

В одном варианте осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка, используемые в композициях и способах, предложенных в данном документе, имеют период полужизни, составляющий по меньшей мере 12 часов после введения. В другом варианте осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка имеют период полужизни, составляющий по меньшей мере 24 часа после введения. В других вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка имеют период полужизни, выбранный из вариантов от 642 до 1045, приведенных в табл. 6 из WO 2012/171031, которая включена в

данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

В конкретных аспектах рФВ (рекомбинантный или полученный из плазмы), используемый в соответствии с настоящим изобретением, не модифицирован никакими модификациями конъюгации, посттрансляцией или ковалентными модификациями. В конкретных вариантах осуществления рФВ по настоящему изобретению не модифицирован водорастворимым полимером, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, гидроксилэтилкрахмал, полиуглеводный фрагмент и тому подобное.

В других аспектах рФВ (рекомбинантный или полученный из плазмы), используемый в соответствии с настоящим изобретением, модифицирован посредством конъюгации, посттрансляционной модификации или ковалентной модификации, включая модификации N- или C-концевых остатков, а также модификации выбранных боковых цепей, например, у свободных сульфгидрильных групп, первичных аминов и гидроксильных групп. В одном варианте осуществления водорастворимый полимер связан с белком (напрямую или через линкер) лизиновой группой или другим первичным амином. В одном варианте осуществления белки рФВ по настоящему изобретению могут быть модифицированы путем конъюгации с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, гидроксил-этилкрахмал, полиуглеводный фрагмент и тому подобное.

Водорастворимые полимеры, которые могут быть использованы для модификации рФВ и/или FVIII, включают линейные и разветвленные структуры. Конъюгированные полимеры могут быть присоединены непосредственно к белкам коагуляции по изобретению или, альтернативно, могут быть присоединены через связывающий фрагмент. Неограничивающие примеры конъюгации белков с водорастворимыми полимерами можно найти в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 и 4179337, а также в Abuchowski and Davis "Enzymes as Drugs", Holcenberg and Roberts, Eds., p. 367-383, John Wiley and Sons, New York (1981), и Hermanson G., *Bioconjugate Techniques 2nd Ed.*, Academic Press, Inc. 2008.

Конъюгация белков может быть выполнена с помощью ряда хорошо известных в данной области техники методов, например, см. Hermanson G., *Bioconjugate Techniques 2nd Ed.*, Academic Press, Inc. 2008. Примеры включают связь через пептидную связь между карбоксильной группой на одном из белков коагуляции или водорастворимого полимерного фрагмента и аминогруппой другого, или сложноэфирную связь между карбоксильной группой одного и гидроксильной группой другого. Другая связь, с помощью которой белок коагуляции по данному изобретению может быть конъюгирован с водорастворимым полимерным соединением, осуществляется через основание Шиффа между свободной аминогруппой на полимерной части, которая реагирует с альдегидной группой, образованной на невозстанавливаемом конце полимера при помощи окисления периодатом (Jennings and Lugowski, *J. Immunol.* 1981; 127:1011-8; Fernandes and Gregonradis, *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1341; 26-34). Образовавшееся основание Шиффа можно стабилизировать специфическим восстановлением с помощью NaCNBH₃ с образованием вторичного амина. Альтернативным подходом является получение концевых свободных аминогрупп на полимере путем восстановительного аминирования с NH₄Cl после предварительного окисления. Бифункциональные реагенты можно использовать для связывания двух amino или двух гидроксильных групп. Например, полимер, содержащий аминогруппу, может быть связан с аминогруппой белка коагуляции с помощью таких реагентов, как BS3 (бис(сульфосукцинимидил)суберат/Pierce, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США). Кроме того, гетеробифункциональные сшивающие реагенты, такие как сульфо-EMCS (N-эпсилон-малеимидокапроилокси) сложный эфир сульфосукцинимидил/Pierce), могут быть использованы, например, для связывания аминовых и тиоловых групп. В других вариантах осуществления группа, реагирующая с альдегидом, такая как алкоксид ПЭГ плюс диэтилацеталь бромацетальдегида; ПЭГ плюс ДМСО и уксусный ангидрид, а также ПЭГ хлорид плюс феноксид 4-гидроксибензальдегида, суццинимидовые активные сложные эфиры, активированный дитиокарбонатный ПЭГ, 2,4,5-трихлорфенилхлорформиат и П-нитрофенилхлорформиат, активированный ПЭГ, могут быть использованы в конъюгации коагуляционного белка.

В некоторых аспектах рФВ, используемый в способах по настоящему изобретению, созрел *in vitro* под действием фурина. В дополнительных вариантах осуществления фурин представляет собой рекомбинантный фурин.

В дополнительных аспектах рФВ, используемый в способах по данному изобретению, продуцируется путем экспрессии в культуре клеток млекопитающих с использованием способов, известных в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления культура млекопитающих содержит клетки СНО. В иллюстративном варианте осуществления рФВ включает белок рФВ, выделенный из системы экспрессии клеток СНО. В дополнительном варианте осуществления удаление пропептида происходит *in vitro* путем воздействия про-ФВ на фурин, в еще одном варианте осуществления фурин, используемый для удаления пропептида, представляет собой рекомбинантный фурин. В еще одном варианте осуществления полностью гликозилированные гликаны/ гликаны группы крови АВО отсутствуют.

В других дополнительных вариантах осуществления рФВ, используемый в способах и композициях по настоящему изобретению, экспрессируется в подходящей эукариотической системе хозяина. Примеры

эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Nер и НерG2; клетки насекомых, например клетки SF9, клетки SF21, клетки S2 и клетки High Five; и клетки дрожжей, например клетки *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*. В одном варианте осуществления ФВ может экспрессироваться в клетках дрожжей, клетках насекомых, клетках птиц, клетках млекопитающих и т.п. Например, в линии клеток человека, линии клеток хомяка или линии клеток мыши. В одном конкретном варианте осуществления линия клеток представляет собой линию клеток CHO, BHK или HEK. Обычно клетки млекопитающих, например, клетки CHO из непрерывной клеточной линии, могут использоваться для экспрессии ФВ по данному изобретению.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую ФВ, может представлять собой вектор. Вектор может быть доставлен вирусом или может быть плазмидой. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, может быть конкретным геном или его биологически функциональной частью. В одном варианте осуществления белок представляет собой по меньшей мере биологически активную часть ФВ. Для экспрессии ФВ можно использовать широкий спектр векторов, которые могут быть выбраны из эукариотических векторов экспрессии. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) векторы для экспрессии в дрожжах, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с использованием таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (ii) векторы для экспрессии в клетках насекомых, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.д., с использованием промоторов, таких как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д., и (iii) векторы для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pCDNA3, pBPV и т.д., и векторы, полученные из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, ретровирусы и т.д., с использованием промоторов, таких как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -актин.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит другие последовательности, подходящие для контролируемой экспрессии белка, такие как промоторные последовательности, энхансеры, ТАТА-боксы, сайты инициации транскрипции, полилинкеры, сайты рестрикции, поли-А-последовательности, последовательности процессинга белка, маркеры отбора и тому подобное, которые обычно известны специалисту в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления способы культивирования клеток могут включать применение микроносителя. В некоторых вариантах осуществления культуры клеток могут быть выполнены в больших биореакторах в условиях, подходящих для обеспечения больших удельных по площади поверхности культуры для достижения высокой плотности клеток и экспрессии белка. Одним из средств обеспечения таких условий роста является использование микроносителей для культивирования клеток в биореакторах с мешалкой. Концепция роста клеток на микроносителях была впервые описана van Wezel (van Wezel, A. L., *Nature* 216:64-5 (1967)) и позволяет прикреплять клетки к поверхности мелких твердых частиц, взвешенных в среде для выращивания. Эти методы обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и, таким образом, позволяют эффективно использовать питательные вещества. Кроме того, для экспрессии секретируемых белков в линиях эукариотических клеток увеличенное соотношение поверхности к объему позволяет достичь более высоких уровней секреции и, следовательно, более высоких выходов белков в супернатанте культуры. Наконец, эти методы позволяют легко наращивать эукариотические экспрессионные культуры.

Клетки, экспрессирующие ФВ, могут быть связаны со сферическим или пористым микроносителем во время роста культуры клеток. Микроноситель может быть микроносителем, выбранным из группы микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина и целлюлозы и других, как описано в Butler (1988. In: Spier & Griffiths, *Animal Cell Biotechnology* 3:283-303). Также возможно выращивать клетки до биомассы на сферических микроносителях и субкультивировать клетки, когда они достигают конечной биомассы ферментера и до продукции экспрессированного белка на пористом микроносителе, или наоборот. Подходящие сферические микроносители могут включать микроносители с гладкой поверхностью, такие как Cytodex™ 1, Cytodex™ 2 и Cytode™ 3 (GE Healthcare), и макропористые микроносители, такие как Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

В некоторых вариантах осуществления рФВ экспрессируется в клетках, культивируемых в среде для культивирования клеток, которая продуцирует рФВ с высокой молекулярной массой. Термины "раствор для культивирования клеток", "среда или среды для культивирования клеток" и "супернатант культуры клеток" относятся к аспектам процессов культивирования клеток, обычно хорошо известным в данной области техники. В контексте настоящего изобретения раствор культуры клеток может включать среду для культивирования клеток и супернатант культуры клеток. Среда для культивирования клеток добавляется извне к раствору для культивирования клеток, необязательно вместе с добавками, для обеспечения питательных веществ и других компонентов для культивирования клеток, экспрессирующих ФВ. Супернатант клеточной культуры относится к раствору клеточной культуры, содержащему питательные вещества и другие компоненты из клеточной культуральной среды, а также продукты, высвобождаемые, метаболизирующиеся и/или выводимые из клеток во время культивирования. В дополнитель-

ных вариантах осуществления среда может не содержать белков животных и иметь определенный химический состав. Способы приготовления культуральной среды определенного химического состава, не содержащей животных белков, известны в данной области техники, например, в US 2008/0009040 и US 2007/0212770, которые оба включены в данный документ для всех целей и, в частности, для всех объектов, связанных со средами для культивирования клеток. "Не содержит белка" и родственные термины относятся к белку, который происходит из источника, экзогенного по отношению к клеткам в культуре или отличного от них, которые естественным образом выделяют белки во время роста. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит полипептидов. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит сыворотки. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит белков животных. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит компонентов животного происхождения. В другом варианте осуществления культуральная среда содержит белок, например животный белок из сыворотки, такой как fetalная сыворотка теленка. В другом варианте осуществления в культуру экзогенно добавлены рекомбинантные белки. В другом варианте осуществления белки получены от сертифицированного животного, свободного от патогенов. Используемый в данном документе термин "химически определенный" означает, что среда не содержит каких-либо неопределенных добавок, таких как, например, экстракты компонентов животных, органов, желез, растений или дрожжей. Соответственно, каждый компонент химически определенной среды точно определен. В предпочтительном варианте осуществления среды не содержат компонентов животного происхождения и белков.

В других вариантах осуществления после очистки из культуры клеток млекопитающих rFVIII восстанавливают перед введением. В других дополнительных вариантах осуществления rФВ обрабатывают фурином до или после восстановления. В дополнительных вариантах осуществления фурин представляет собой рекомбинантный фурин. В дополнительных вариантах осуществления rФВ не подвергается воздействию ADAMTS13, в результате чего в композициях rФВ по изобретению присутствуют сверхкрупные (т.е. состоящие из 10 или более субъединиц).

В конкретных аспектах rФВ, используемый в способах по настоящему изобретению, содержится в составе, содержащем буфер, сахар и/или сахарный спирт (включая, без ограничения, трегалозу и маннит), стабилизатор (такой как глицин) и поверхностно-активное вещество (такое как полисорбат 80). В дополнительных вариантах осуществления, для составов, содержащих rFVIII, состав может дополнительно содержать натрий, гистидин, кальций и глутатион.

В одном аспекте составы, содержащие rФВ, лиофилизируют перед введением. Лиофилизацию проводят с использованием общепринятых в данной области техники методов и должна быть оптимизирована для разрабатываемой композиции [Tang et al., Pharm Res. 21:191-200. (2004) и Chang et al., Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

Способы получения фармацевтических составов могут включать одну или более из следующих стадий: добавление стабилизирующего агента, как описано в данном документе, к указанной смеси перед лиофилизацией, добавление по меньшей мере одного агента, выбранного из объемобразующего агента, агента, регулирующего осмоляльность, и поверхностно-активного вещества, каждый из которых, как описано в данном документе, к указанной смеси перед лиофилизацией. Лиофилизованный состав, в одном аспекте, по меньшей мере, состоит из одного или более из буфера, объемобразующего агента и стабилизатора. В этом аспекте полезность поверхностно-активного вещества оценивают и выбирают в случаях, когда агрегация во время стадии лиофилизации или во время восстановления становится проблемой. Соответствующий буферный агент включен для поддержания состава в стабильных пределах pH во время лиофилизации.

Стандартная практика восстановления лиофилизованного материала заключается в добавлении объема чистой воды или стерильной воды для инъекций (WFI) (обычно эквивалентного объему, удаляемому во время лиофилизации), хотя разбавленные растворы антибактериальных агентов иногда используются в производстве фармацевтических препаратов для парентерального введения [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Соответственно, предложены способы приготовления восстановленных композиций рекомбинантного ФВ, включающие стадию добавления разбавителя к лиофилизованной композиции рекомбинантного ФВ по изобретению.

Ллиофилизованный материал может быть восстановлен в виде водного раствора. Разнообразные водные носители, например, стерильная вода для инъекций, вода с консервантами для многократного использования или вода с соответствующими количествами поверхностно-активных веществ (например, водная суспензия, которая содержит активное соединение в смеси с эксципиентами, подходящими для производства водных суспензий). В различных аспектах такие эксципиенты представляют собой суспендирующие агенты, например, но без ограничения, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и камедь акации; диспергирующие или смачивающие агенты представляют собой встречающийся в природе фосфатид, например, без ограничения, лецитин, или продукты конденсации оксида алкилена с жирными кислотами, например, без ограничения, полиоксиэтилен стеарат или продукты конденсации оксида этилена с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, без ограничения, гептадекаэтиленок-

сидетанол или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, такие как моноолеат полиоксиэтиленсорбита, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например, и без ограничения, моноолеат полиэтиленсорбитана. В различных аспектах водные суспензии также содержат один или более консервантов, например, без ограничения, этил или *n*-пропил, *p*-гидроксibenзоат.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению представляют собой жидкие составы для введения с помощью шприца или другого сосуда для хранения. В дополнительных вариантах осуществления эти жидкие составы получают из лиофилизованного материала, описанного в данном документе, восстановленного в виде водного раствора.

В дополнительном аспекте композиции по изобретению дополнительно содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фразы "фармацевтически" или "фармакологически" приемлемые относятся к молекулярным объектам и композициям, которые являются стабильными, ингибируют деградацию белка, такую как продукты агрегации и расщепления, и, кроме того, не вызывают аллергических или других побочных реакций при введении с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, как описано ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые и все клинически применимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и фунгицидные агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное, включая агенты, описанные выше.

Получение рекомбинантного ФВ.

Свободный зрелый рекомбинантный фактор фон Виллебранда (рФВ) по данному изобретению можно получить рекомбинантно. Специалист в данной области техники распознает пригодные способы экспрессии рекомбинантного белка в клетке-хозяине. В некоторых случаях способ включает экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рФВ, в клетке-хозяине, такой как клетка CHO, и культивирование полученной клетки-хозяина при определенных условиях для продуцирования рФВ, препро-ФВ, про-ФВ и т.п.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую ФВ, может представлять собой вектор экспрессии. Вектор может быть доставлен вирусом или может быть плазмидой. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, может быть конкретным геном или его биологически функциональной частью. В одном варианте осуществления белок представляет собой по меньшей мере биологически активную часть ФВ. Последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать другие последовательности, подходящие для контролируемой экспрессии белка, такие как промоторные последовательности, энхансеры, ТАТА-боксы, сайты инициации транскрипции, полилинкеры, сайты рестрикции, поли-А-последовательности, последовательности процессинга белка, маркеры отбора и тому подобное, которые обычно известны специалисту в данной области техники.

Для экспрессии ФВ можно использовать широкий спектр векторов, которые могут быть выбраны из эукариотических векторов экспрессии. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) векторы для экспрессии в дрожжах, такие как рАО, рPIC, рYES, рMET, с использованием таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (ii) векторы для экспрессии в клетках насекомых, такие как рMT, рAc5, рIB, рMIB, рBAC и т.д., с использованием промоторов, таких как PH, р10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д., и (iii) векторы для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как рSVL, рCMV, рRc/RSV, рcDNA3, рBPV и т.д., и векторы, полученные из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, ретровирусы и т.д., с использованием промоторов, такие как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -актин.

В некоторых аспектах рФВ, используемый в способах по данному изобретению, продуцируется путем экспрессии в культуре клеток млекопитающих с использованием способов, известных в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления культура млекопитающих содержит клетки CHO. В дополнительных вариантах осуществления рФВ коэкспрессируется с рекомбинантным фактором VIII (rFVIII) в той же культуре. В таких вариантах осуществления рФВ и rFVIII очищают вместе (совместно очищают) или по отдельности с использованием способов, известных в данной области техники. В других вариантах осуществления рФВ экспрессируется в культуре, не содержащей rFVIII.

В некоторых вариантах осуществления рФВ экспрессируется и выделяется из подходящей эукариотической системы хозяина. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Nep и HepG2; клетки насекомых, например клетки SF9, клетки SF21, клетки S2 и клетки High Five; и клетки дрожжей, например клетки *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*. В одном варианте осуществления ФВ может экспрессироваться в клетках дрожжей, клетках насекомых, клетках птиц, клетках млекопитающих и т.п. Например, в линии клеток человека, линии клеток хомяка или линии клеток мыши. В одном конкретном варианте осуществления линия клеток представляет собой линию клеток CHO, BHK или HEK. Обычно клетки млекопитающих, например, клетки CHO из непрерывной клеточной линии, могут использоваться для экспрессии ФВ по данному изобретению. В определенных случаях белок ФВ экспрессируется и выделяется из системы экспрессии

клеток СНО.

ФВ можно продуцировать в системе культивирования клеток или любым методом культивирования клеток, специалистами в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления культивирование клеток можно проводить в больших биореакторах в условиях, подходящих для обеспечения больших удельных по объему площадей поверхности культуры для достижения высокой плотности клеток и экспрессии белка. Одним из средств обеспечения таких условий роста является использование микроносителей для культивирования клеток в биореакторах с мешалкой. Концепция роста клеток на микроносителях была впервые описана van Wezel (van Wezel, A. L., *Nature*, 1967, 216:64-5) и позволяет прикреплять клетки к поверхности мелких твердых частиц, взвешенных в среде для выращивания. Эти методы обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и, таким образом, позволяют эффективно использовать питательные вещества. Кроме того, для экспрессии секретлируемых белков в линиях эукариотических клеток увеличенное соотношение поверхности к объему позволяет достичь более высоких уровней секреции и, следовательно, более высоких выходов белков в супернатанте культуры. Наконец, эти методы позволяют легко наращивать эукариотические экспрессионные культуры.

Клетки, экспрессирующие ФВ, могут быть связаны со сферическим или пористым микроносителем во время роста культуры клеток. Микроноситель может быть микроносителем, выбранным из группы микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина и целлюлозы и других, как описано в Butler (1988. In: Spier & Griffiths, *Animal Cell Biotechnology* 3:283-303). Также возможно выращивать клетки до биомассы на сферических микроносителях и субкультивировать клетки, когда они достигают конечной биомассы ферментера и до продукции экспрессированного белка на пористом микроносителе, или наоборот. Подходящие сферические микроносители могут включать микроносители с гладкой поверхностью, такие как Cytodex™ 1, Cytodex™ 2 и Cytodex™ 3 (GE Healthcare), и макропористые микроносители, такие как Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

В другом варианте осуществления пропептид ФВ отщепляется от незрелого ФВ *in vitro* посредством воздействия на про-ФВ фурином. В некоторых вариантах осуществления фурин, используемый для расщепления пропептида, представляет собой рекомбинантный фурин.

В некоторых вариантах осуществления рФВ экспрессируется в клетках, культивируемых в среде для культивирования клеток, которая продуцирует рФВ с высокой молекулярной массой. Термины "раствор для культивирования клеток", "среда или среды для культивирования клеток" и "супернатант культуры клеток" относятся к аспектам процессов культивирования клеток, обычно хорошо известным в данной области техники. В контексте настоящего изобретения раствор культуры клеток может включать среду для культивирования клеток и супернатант культуры клеток. Среда для культивирования клеток добавляется *in vivo* к раствору для культивирования клеток, необязательно вместе с добавками, для обеспечения питательных веществ и других компонентов для культивирования клеток, экспрессирующих ФВ. Супернатант клеточной культуры относится к раствору клеточной культуры, содержащему питательные вещества и другие компоненты из клеточной культуральной среды, а также продукты, высвобождаемые, метаболизирующиеся и/или выводимые из клеток во время культивирования. В дополнительных вариантах осуществления среда может не содержать белков животных и иметь определенный химический состав. Способы приготовления культуральной среды определенного химического состава, не содержащей животных белков, известны в данной области техники, например, в US 2006/0094104, US 2007/0212770 и US 2008/0009040, которые оба включены в данный документ для всех целей и, в частности, для всех объектов, связанных со средами для культивирования клеток. "Не содержит белка" и родственные термины относятся к белку, который происходит из источника, экзогенного по отношению к клеткам в культуре или отличного от них, которые естественным образом выделяют белки во время роста. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит полипептидов. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит сыворотки. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит белков животных. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит компонентов животного происхождения. В другом варианте осуществления культуральная среда содержит белок, например животный белок из сыворотки, такой как фетальная сыворотка теленка. В другом варианте осуществления в культуру экзогенно добавлены рекомбинантные белки. В другом варианте осуществления белки получены от сертифицированного животного, свободного от патогенов. Используемый в данном документе термин "химически определенный" означает, что среда не содержит каких-либо неопределенных добавок, таких как, например, экстракты компонентов животных, органов, желез, растений или дрожжей. Соответственно, каждый компонент химически определенной среды точно определен. В предпочтительном варианте осуществления среды не содержат компонентов животного происхождения и белков.

В некоторых вариантах осуществления культура клеток, экспрессирующих ФВ, может поддерживаться в течение по меньшей мере около 7 суток или по меньшей мере около 14 суток, 21 суток, 28 суток или по меньшей мере около 5 недель, 6 недель, 7 недель или по меньшей мере около 2 месяцев или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. Плотность клеток, при которой поддерживается культура клеток для получения рекомбинантного белка ФВ, будет зависеть от условий культиви-

вирования и среды, используемой для экспрессии белка. Специалист в данной области техники легко сможет определить оптимальную плотность клеток для культуры клеток, продуцирующих ФВ. В одном варианте осуществления культура поддерживается при плотности клеток от около $0,5 \times 10^6$ до 4×10^7 клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток поддерживается при концентрации от около $1,0 \times 10^6$ до около $1,0 \times 10^7$ клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток поддерживается при концентрации от около $1,0 \times 10^6$ до около $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток поддерживается при концентрации от около $1,0 \times 10^6$ до около $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток может поддерживаться на уровне от около $2,0 \times 10^6$ до около $4,0 \times 10^6$, или от около $1,0 \times 10^6$ до около $2,5 \times 10^6$, или от около $1,5 \times 10^6$ до около $3,5 \times 10^6$, или любого другого аналогичного диапазона в течение длительного периода времени. По прошествии подходящего времени в культуре клеток рФВ можно выделить из системы экспрессии с использованием способов, известных в данной области техники.

В конкретном варианте осуществления плотность клеток в непрерывной культуре клеток для продуцирования рФВ поддерживается на уровне не более $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в течение длительного периода. В других конкретных вариантах осуществления плотность клеток поддерживается на уровне не более $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл или менее. В одном варианте осуществления плотность клеток поддерживается на уровне от $1,5 \times 10^6$ клеток/мл до $2,5 \times 10^6$ клеток/мл.

В одном варианте осуществления описанных выше культур клеток раствор культуры клеток содержит добавку для среды, содержащую медь. Такие растворы для культивирования клеток описаны, например, в патенте США № 8852888 и патенте США № 9409971, которые полностью включены в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех положений, относящихся к способам культивирования клеток и композициям для получения рекомбинантного ФВ.

Полинуклеотидная и аминокислотная последовательности препро-ФВ представлены в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно, и доступны в GenBank под номерами доступа NM_000552 (мРНК фактора фон Виллебранда (ФВ) Homo sapiens) и NP_000543, соответственно. Аминокислотная последовательность, соответствующая зрелому белку ФВ, представлена в SEQ ID NO: 3 (соответствует аминокислотам 764-2813 полноразмерной аминокислотной последовательности препро-ФВ). В некоторых вариантах осуществления ФВ имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления рФВ по данному изобретению имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. См., например, патент США № 8597910, патентную публикацию США № 2016/0129090, а также фиг. 5A-5C, 6A-6J, и 7A-7G.

Одна форма полезного рФВ обладает по меньшей мере свойством стабилизации *in vivo*, например, связывание по меньшей мере одной молекулы фактора VIII (FVIII) и, возможно, имеющее фармакологически приемлемый профиль гликозилирования. Его конкретные примеры включают ФВ без домена A2, поэтому он устойчив к протеолизу (Lankhof et al., *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997) и фрагмент ФВ от Val 449 до Asn 730, включая гликопротеиновый I_b-связывающий домен и сайты связывания для коллагена и гепарина (Pietu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989). Определение способности ФВ стабилизировать по меньшей мере одну молекулу FVIII, в одном аспекте, проводят у млекопитающих с дефицитом ФВ в соответствии с методами, известными в данной области техники.

рФВ по данному изобретению можно получить любым способом, известным в данной области техники. Один конкретный пример раскрыт в WO86/06096, опубликованной 23 октября 1986 г., и в заявке на патент США № 07/559509, поданной 23 июля 1990 г., которая включена в данное описание посредством ссылки в отношении способов получения рекомбинантного ФВ. Таким образом, в данной области техники известны способы (i) получения рекомбинантной ДНК с помощью генной инженерии, например, посредством обратной транскрипции РНК и/или амплификации ДНК, (ii) введения рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки путем трансфекции, например, посредством электропорации или микроинъекции, (iii) культивирование трансформированных клеток, например, непрерывным или периодическим способом, (iv) экспрессия ФВ, например, конститутивно или при индукции, и (v) выделение ФВ, например, из культуральной среды или путем сбора трансформированных клеток, чтобы (vi) получить очищенный рФВ, например, с помощью анионообменной хроматографии или аффинной хроматографии. Рекомбинантный ФВ, в одном аспекте, получают в трансформированных клетках-хозяевах с использованием методов рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области техники. Например, последовательности, кодирующие полипептид, могут быть вырезаны из ДНК с использованием подходящих рестрикционных ферментов. Альтернативно, в другом аспекте молекула ДНК синтезируется с использованием методов химического синтеза, таких как фосфорамидатный метод. Кроме того, в еще одном аспекте используется комбинация этих методов.

В данном изобретении также предложены векторы, кодирующие полипептиды по изобретению в соответствующем хозяине. Вектор включает полинуклеотид, который кодирует полипептид, функционально связанный с соответствующими последовательностями контроля экспрессии. Способы осуществления этого функционального связывания до или после встраивания полинуклеотида в вектор хорошо известны. Последовательности контроля экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты связывания рибосом, стартовые сигналы, стоп-сигналы, кэп-сигналы, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции. Полученный вектор, содержащий полинуклеотид, используется для трансформации подходящего хозяина. Это преобразование может быть выполнено с использованием методов, хорошо известных в данной области техники.

Любые из большого количества доступных и хорошо известных клеток-хозяев используются на практике настоящего изобретения. Выбор конкретного хозяина зависит от ряда факторов, известных в данной области техники, включая, например, совместимость с выбранным вектором экспрессии, токсичность пептидов, кодируемых молекулой ДНК, скорость трансформации, легкость выделения пептидов, характеристики экспрессии, биобезопасность и стоимость. Баланс этих факторов должен быть достигнут с пониманием того, что не все клетки-хозяева одинаково эффективны для экспрессии конкретной последовательности ДНК. В рамках этих общих рекомендаций полезные микробные клетки-хозяева включают, без ограничения, бактерии, дрожжи и другие грибы, насекомых, растения, клетки млекопитающих (включая человека) в культуре, или других хозяев, известных в данной области техники.

Трансформированные клетки-хозяева культивируют в обычных условиях культивирования, так чтобы желаемые соединения экспрессировались. Такие условия культивирования хорошо известны в данной области техники. Наконец, полипептиды очищают от культуральной среды или самих клеток-хозяев способами, хорошо известными в данной области техники.

В зависимости от клетки-хозяина, используемой для экспрессии соединения по изобретению, углеводные (олигосахаридные) группы необязательно присоединяются к сайтам, которые, как известно, являются сайтами гликозилирования в белках. Как правило, О-связанные олигосахариды присоединяются к остаткам серина (Ser) или треонина (Thr), тогда как N-связанные олигосахариды присоединяются к остаткам аспарагина (Asn), когда они являются частью последовательности Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. X предпочтительно представляет собой одну из 19 природных аминокислот, не считая пролина. Структуры N-связанных и О-связанных олигосахаридов и сахарных остатков, обнаруженных в каждом типе, различны. Одним из типов сахара, который обычно встречается как в N-связанных, так и в О-связанных олигосахаридах, является N-ацетилнейраминавая кислота (называемая сиаловой кислотой). Сиаловая кислота обычно является концевым остатком как N-связанных, так и О-связанных олигосахаридов и, в силу своего отрицательного заряда, в одном аспекте придает кислотные свойства гликозилированному соединению. Такой сайт(ы) может быть включен в линкер соединений по данному изобретению и предпочтительно гликозилируется клеткой во время рекомбинантного продуцирования полипептидных соединений (например, в клетках млекопитающих, таких как CHO, BHK, COS). В других аспектах такие сайты гликозилируют с помощью синтетических или полусинтетических процедур, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления сиализацию (также называемую сиалированием) можно проводить на колонке как часть описанных в данном документе процедур очистки (включая методы анионного обмена, катионного обмена, исключения по размеру и/или иммуноаффинные методы). В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению стабильности рФВ по сравнению с рФВ, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению стабильности рФВ в кровотоке (например, после введения субъекту) по сравнению с рФВ, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления стабильность сиалированного рФВ увеличивается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с рФВ, который не подвергся сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению периода полужизни рФВ по сравнению с рФВ, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению периода полужизни рФВ в кровотоке (например, после введения субъекту) по сравнению с рФВ, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления период полужизни сиалированного рФВ увеличивается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с рФВ, который не подвергся сиалированию. В некоторых вариантах осуществления увеличенный период полужизни сиалированного рФВ приводит к рФВ, который стабилен в течение 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов или более в кровотоке (например, после введения субъекту) по сравнению с рФВ, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование увеличивает количество 2,3-сиалирования и/или 2,6-сиалирования. В некоторых вариантах осуществления сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и/или 2,6-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминавой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминавой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах

осуществления 2,3 сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии.

В некоторых вариантах осуществления 2,6 сиалирование усиливается путем добавления 2,6-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления 2,3 сиалирование и/или 2,6 сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и/или 2,6-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления CMP-NANA химически или ферментативно модифицирован для переноса модифицированной сиаловой кислоты в потенциально свободное положение. В некоторых вариантах осуществления сиалирование выполняют путем загрузки рФВ на смолу, промывки одним или более буферами, как описано в данном документе, для удаления нежелательных примесей, применения одного или более буферов, содержащих сиалилтрансферазу и CMP-NANA, в условиях, обеспечивающих дополнительное сиалирование, и промывки одним буфером или несколькими буферами для удаления избытка реагентов сиалирования, и элюирование одним или более буферами улучшенного рФВ (например, рФВ с увеличенным сиалированием). В некоторых вариантах осуществления процесс сиалирования выполняется как часть метода катионного обмена, метода анионного обмена, метода исключения по размеру или метода иммуноаффинной очистки, как описано в данном документе.

Альтернативно, соединения получают синтетическими методами, используя, например, методы твердофазного синтеза. Подходящие методы хорошо известны в данной области техники и включают те, которые описаны в Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis et al. (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart and Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; патент США № 3941763; Finn et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 105-253; и Erickson et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 257-527. Твердофазный синтез является предпочтительным методом получения индивидуальных пептидов, поскольку это наиболее экономичный метод получения небольших пептидов

Фрагменты, варианты и аналоги ФВ могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники. Фрагменты полипептида могут быть получены с использованием, без ограничения, ферментативного расщепления (например, трипсина, химотрипсина), а также с использованием рекомбинантных средств для создания фрагментов полипептида, имеющих конкретную аминокислотную последовательность. Могут быть получены полипептидные фрагменты, включающие область белка, обладающего конкретной активностью, такую как домен мультимеризации или любой другой идентифицируемый домен ФВ, известный в данной области техники.

Способы получения аналогов полипептидов также хорошо известны. Аналоги аминокислотной последовательности полипептида могут быть аналогами с замещением, инсерцией, добавлением или делецией. Делеционные аналоги, включая фрагменты полипептида, лишены одного или более остатков нативного белка, которые не являются существенными для функции или иммуногенной активности. Инсерционные аналоги включают добавление, например, аминокислоты (аминокислот) в неконцевую точку полипептида. Этот аналог может включать, например, но без ограничения, вставку иммунореактивного эпитопа или просто одиночный остаток. Аналоги добавления, включая фрагменты полипептида, включают добавление одной или более аминокислот на одном или обоих концах белка и включают, например, слитые белки. Также рассматриваются комбинации вышеупомянутых аналогов.

Замещающие аналоги обычно заменяют одну аминокислоту дикого типа на другую в одном или более сайтах в пределах белка и могут быть разработаны для модуляции одного или более свойств полипептида без полной потери других функций или свойств. В одном аспекте замены представляют собой консервативные замены. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену аминокислоты на аминокислоту, имеющую боковую цепь или аналогичный химический характер. Подобные аминокислоты для проведения консервативных замен включают аминокислоты с кислой боковой цепью (глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота); основной боковой цепью (аргинин, лизин, гистидин); боковой цепью полярного амида (глутамин, аспарагин); гидрофобной алифатической боковой цепью (лейцин, изолейцин, валин, аланин, глицин); ароматической боковой цепью (фенилаланин, триптофан, тирозин); небольшой боковой цепью (глицин, аланин, серин, треонин, метионин); или алифатической гидроксильной боковой цепью (серин, треонин).

В одном аспекте аналоги по существу гомологичны или практически идентичны рекомбинантному ФВ, из которого они получены. Аналоги включают те, которые сохраняют по меньшей мере часть биологической активности полипептида дикого типа, например, активность свертывания крови.

Рассматриваемые варианты полипептидов включают, без ограничения, полипептиды, химически модифицированные такими методами, как убиквитинирование, гликозилирование, включая полисиалирование (или полисиалирование), конъюгацию с терапевтическими или диагностическими агентами, мечение, ковалентное присоединение полимера, такое как пегилирование (дериватизация полиэтиленгликолем), введение негидролизующих связей, и вставка или замещение путем химического синтеза амино-

кислот, таких как орнитин, которые обычно не встречаются в белках человека. Варианты сохраняют такие же или практически одинаковые связывающие свойства немодифицированных молекул по изобретению. Такая химическая модификация может включать прямое или косвенное (например, через линкер) присоединение агента к полипептиду ФВ. В случае непрямого присоединения предполагается, что линкер может быть гидролизуемым или негидролизуемым.

Получение аналогов пегилированного полипептида в одном аспекте будет включать стадии (а) реакции полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, при которых полипептид связывающей конструкции присоединяется к одной или более группам ПЭГ, и (б) получение продукта(ов) реакции. В общем, оптимальные условия реакции для реакций ацилирования определяются на основе известных параметров и желаемого результата. Например, чем больше соотношение ПЭГ:белок, тем больше процент полипегилированного продукта. В некоторых вариантах осуществления связывающая конструкция имеет один фрагмент ПЭГ на N-конце. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) может быть присоединен к фактору свертывания крови, например, для обеспечения более длительного периода полужизни *in vivo*. Группа ПЭГ может иметь любую подходящую молекулярную массу и быть линейной или разветвленной. Средняя молекулярная масса ПЭГ находится в диапазоне от около 2 кДа ("кДа") до около 100 кДа, от около 5 кДа до около 50 кДа или от около 5 кДа до около 10 кДа. В некоторых аспектах группы ПЭГ присоединены к фактору свертывания крови посредством ацилирования или восстановительного алкилирования через природную или сконструированную реактивную группу в фрагменте ПЭГ (например, альдегидную, amino, тиоловую или сложноэфирную группу) к реакционноспособной группе на фактор свертывания крови (например, альдегидная, amino- или сложноэфирная группа) или любым другим способом, известным в данной области техники.

Способы получения полисиалированного полипептида описаны в патентной публикации США 20060160948, Fernandes et Gregoriadis; *Biochim. Biophys. Acta* 1341: 26-34, 1997 и Saenko et al., *Haemophilia* 12:42-51, 2006. Вкратце, раствор коломиновой кислоты (СА), содержащий 0,1 M NaIO₄, перемешивают в темноте при комнатной температуре для окисления СА. Активированный раствор СА диализуют против, например, 0,05 M натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, в темноте, и этот раствор добавляют к раствору рФВ и инкубируют в течение 18 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном встряхивании. Свободные реагенты необязательно отделяют от конъюгата рФВ-полисиаловая кислота, например, ультрафильтрацией/диалитацией. Конъюгация рФВ с полисиаловой кислотой достигается с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего реагента (Migneault et al., *Biotechniques* 37: 790-796, 2004).

В другом аспекте также предполагается, что полипептиды препро-ФВ и про-ФВ будут обеспечивать терапевтический эффект в композициях по данному изобретению. Например, в патенте США № 7005502 описан фармацевтический препарат, содержащий значительные количества про-ФВ, который индуцирует образование тромбина *in vitro*. Помимо рекомбинантных, биологически активных фрагментов, вариантов или других аналогов встречающегося в природе зрелого ФВ, данное изобретение предполагает использование рекомбинантных биологически активных фрагментов, вариантов или аналогов полипептидов препро-ФВ (приведен в SEQ ID NO: 2) или про-ФВ (аминокислотные остатки 23-764 SEQ ID NO: 2), или рФВ (приведен в SEQ ID NO: 3) в составах, описанных в данном документе.

Полинуклеотиды, кодирующие фрагменты, варианты и аналоги, могут быть легко получены специалистом в области кодирования биологически активных фрагментов, вариантов или аналогов встречающейся в природе молекулы, которые обладают такой же или подобной биологической активностью, что и природная молекула. В различных аспектах эти полинуклеотиды получают с использованием методов ПЦР, ферментативного расщепления/лигирования молекулы, кодирующей ДНК, и т.п. Таким образом, специалист в данной области техники сможет создавать изменения единичных оснований в цепи ДНК, приводящие к измененному кодону и миссенс-мутации, с использованием любого метода, известного в данной области техники, включая, без ограничения этим, сайт-специфический мутагенез. Используемая в данном документе фраза "умеренно строгие условия гибридизации" означает, например, гибридизацию при 42°C в 50% формамиде и отмывку при 60°C в 0,1 x SSC, 0,1% SDS. Специалистам в данной области техники понятно, что изменение этих условий происходит в зависимости от длины и содержания нуклеотидных оснований GC последовательностей, подлежащих гибридизации. Стандартные в данной области техники формулы подходят для определения точных условий гибридизации. См. Sambrook et al., 9.47-9.51 в *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Мультимеры ФВ.

Оценка количества и процентного содержания мультимеров рФВ может быть проведена с использованием методов, известных в данной области техники, включая, без ограничения, методы с использованием электрофореза и методы эксклюзионной хроматографии для разделения мультимеров ФВ по размеру, например, как обсуждается в Cumming et al., (*J Clin Pathol.*, 1993 May; 46(5): 470-473, который включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех рекомендаций, относящихся к оценке мультимеров ФВ). Такие методы могут дополнительно включать методы иммуноблоттинга (такие как вестерн-блоттинг), при которых гель подвергают иммуноблоттингу с помощью

радиоактивно меченного антитела к ФВ с последующим хемилюминесцентным обнаружением (см., например, Wen et al., J. Clin. Lab. Anal., 1993, 7: 317-323, который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, относящихся к оценке мультимеров ФВ). Дополнительные анализы на ФВ включают анализ активности антигена ФВ (ФВ: Ag), ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:КР) и коллагенсвязывающей активности ФВ (ФВ:КСА), которые часто используются для диагностики и классификации болезни фон Виллебранда (см., например, Favaloro et al., Pathology, 1997, 29(4): 341-456; Sadler, JE, Annu Rev Biochem, 1998, 67:395-424 и Turecek et al., Semin Thromb Hemost, 2010, 36:510-521, которые настоящим включены в качестве ссылки в полном объеме для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с анализами на ФВ). В некоторых вариантах осуществления рФВ, полученный с использованием данных способов, включает любой профиль мультимеров, присутствующий в загрузочной выборке рФВ. В некоторых вариантах осуществления рФВ, полученный с использованием данных способов, включает физиологические встречающиеся профили мультимеров, а также профили сверхкрупных мультимеров ФВ.

Анализ ФВ.

При первичном гемостазе ФВ служит мостом между тромбоцитами и определенными компонентами внеклеточного матрикса, такими как коллаген. Биологическая активность ФВ в этом процессе может быть измерена различными анализами *in vitro* (Turecek et al., Semin Thromb Hemost, 2010, 36: 510-521).

Анализ ФВ:кофактор ристоцетина (ФВ:КР) основан на агглютинации свежих или фиксированных формалином тромбоцитов, индуцированной антибиотиком ристоцетином в присутствии ФВ. Степень агглютинации тромбоцитов зависит от концентрации ФВ и может быть измерена турбидиметрическим методом, например, с помощью агрегометра (Weiss et al., J. Clin. Invest., 1973, 52: 2708-2716; Macfarlane et al., Thromb. Diath. Haemorrh., 1975, 34: 306-308). Как предусмотрено в данном документе, специфическая ристоцетин-кофакторная активность ФВ (ФВ:КР) по данному изобретению обычно описывается в единицах мЕд/мкг ФВ, как измерено с использованием анализов *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления рФВ, очищенный способами по данному изобретению, имеет удельную активность по меньшей мере около 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 или более мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления рФВ, используемый в описанных в данном документе способах, имеет удельную активность от 20 до 150 мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления рФВ имеет удельную активность от 30 до 120 мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления рФВ имеет удельную активность от 40 до 90 мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления рФВ обладает специфической активностью, выбранной из вариантов с 1 по 133, указанных в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Примерные варианты осуществления специфической активности рФВ, обнаруженной в композициях и использованных в способах, предложенных в данном документе

(мЕд/мкг)		(мЕд/мкг)		(мЕд/мкг)		(мЕд/мкг)	
20	Вар. 1	110	Вар. 35	40-150	Вар. 68	70-120	Вар. 101
22,5	Вар. 2	115	Вар. 36	40-140	Вар. 69	70-110	Вар. 102
25	Вар. 3	120	Вар. 37	40-130	Вар. 70	70-100	Вар. 103
27,5	Вар. 4	125	Вар. 38	40-120	Вар. 71	70-90	Вар. 104
30	Вар. 5	130	Вар. 39	40-110	Вар. 72	70-80	Вар. 105
32,5	Вар. 6	135	Вар. 40	40-100	Вар. 73	80-150	Вар. 106
35	Вар. 7	140	Вар. 41	40-90	Вар. 74	80-140	Вар. 107
37,5	Вар. 8	145	Вар. 42	40-80	Вар. 75	80-130	Вар. 108
40	Вар. 9	150	Вар. 43	40-70	Вар. 76	80-120	Вар. 109
42,5	Вар. 10	20-150	Вар. 44	40-60	Вар. 77	80-110	Вар. 110
45	Вар. 11	20-140	Вар. 45	40-50	Вар. 78	80-100	Вар. 111
47,5	Вар. 12	20-130	Вар. 46	50-150	Вар. 79	80-90	Вар. 112
50	Вар. 13	20-120	Вар. 47	50-140	Вар. 80	90-150	Вар. 113
52,5	Вар. 14	20-110	Вар. 48	50-130	Вар. 81	90-140	Вар. 114
55	Вар. 15	20-100	Вар. 49	50-120	Вар. 82	90-130	Вар. 115
57,5	Вар. 16	20-90	Вар. 50	50-110	Вар. 83	90-120	Вар. 116
60	Вар. 17	20-80	Вар. 51	50-100	Вар. 84	90-110	Вар. 117
62,5	Вар. 18	20-70	Вар. 52	50-90	Вар. 85	90-100	Вар. 118
65	Вар. 19	20-60	Вар. 53	50-80	Вар. 86	100-150	Вар. 119

67,5	Вар. 20	20-50	Вар. 54	50-70	Вар. 87	100-140	Вар. 120
70	Вар. 21	20-40	Вар. 55	50-60	Вар. 88	100-130	Вар. 121
72,5	Вар. 22	30-150	Вар. 56	60-150	Вар. 89	100-120	Вар. 122
75	Вар. 23	30-140	Вар. 57	60-140	Вар. 90	100-110	Вар. 123
77,5	Вар. 24	30-130	Вар. 58	60-130	Вар. 91	110-150	Вар. 124
80	Вар. 25	30-120	Вар. 59	60-120	Вар. 92	110-140	Вар. 125
82,5	Вар. 26	30-110	Вар. 60	60-110	Вар. 93	110-130	Вар. 126
85	Вар. 27	30-100	Вар. 61	60-100	Вар. 94	110-120	Вар. 127
87,5	Вар. 28	30-90	Вар. 62	60-90	Вар. 95	120-150	Вар. 128
90	Вар. 29	30-80	Вар. 63	60-80	Вар. 96	120-140	Вар. 129
92,5	Вар. 30	30-70	Вар. 64	60-70	Вар. 97	120-130	Вар. 130
95	Вар. 31	30-60	Вар. 65	70-150	Вар. 98	130-150	Вар. 131
97,5	Вар. 32	30-50	Вар. 66	70-140	Вар. 99	130-140	Вар. 132
100	Вар. 33	30-40	Вар. 67	70-130	Вар. 100	140-150	Вар. 133
105	Вар. 34						

Вар. = Вариант.

рФВ по настоящему изобретению является в высокой степени мультимерным, содержащим от около 10 до около 40 субъединиц. В дополнительных вариантах осуществления мультимерный рФВ, полученный с использованием способов по данному изобретению, содержит около 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления рФВ присутствует в мультимерах, размер которых варьирует от димеров до мультимеров, содержащих более 40 субъединиц (> 10 миллионов дальтон). Самые большие мультимеры обеспечивают множественные участки связывания, которые могут взаимодействовать как с рецепторами тромбоцитов, так и с участками повреждения субэндотелиального матрикса, и являются наиболее гемостатически активной формой ФВ. В некоторых вариантах осуществления рФВ по настоящему изобретению содержит сверхкрупные мультимеры (ULM, англ. ultralarge multimers). Как правило, большие и сверхкрупные мультимеры являются наиболее гемостатически эффективными (см., например, Turecek, P., *Hämostaseologie*, (Vol. 37): Supplement 1, pages S15-S25 (2017)). В некоторых вариантах осуществления рФВ имеет от 500 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления любой желаемый профиль мультимеров может быть получен с использованием описанных способов. В некоторых вариантах осуществления, когда используются методы анионного обмена и/или катионного обмена, рН, проводимость и/или концентрация противоионов буферов на одной или более стадии (стадиях) промывки или градиентных буферов можно изменять для получения желаемого профиля мультимеров. В некоторых вариантах осуществления затем используются методы эксклюзионной хроматографии, критерии сбора могут использоваться для получения желаемого профиля мультимеров. В некоторых вариантах осуществления описанный профиль мультимеров включает сверхкрупные мультимеры. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры составляют по меньшей мере 10000 кДа, по меньшей мере 11000 кДа, по меньшей мере 12000 кДа, по меньшей мере 13000 кДа, по меньшей мере 14000 кДа, по меньшей мере 15000 кДа, по меньшей мере 16000 кДа, по меньшей мере 17000 кДа, по меньшей мере 18000 кДа, по меньшей мере 19000 кДа, по меньшей мере 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 10000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 11000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 12000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 13000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 14000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 15000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 16000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 17000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 18000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхкрупные мультимеры имеют размер от 19000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления рФВ, полученный с использованием данных способов, включает любой профиль мультимеров, присутствующий в загрузочной выборке рФВ. В некоторых вариантах осуществления рФВ, полученный с использованием данных способов, включает физиологически встречающиеся профили мультимеров, а также профили сверхкрупных мультимеров рФВ.

В некоторых вариантах осуществления композиция рФВ, полученная описанным в данном документе способом очистки, имеет распределение олигомеров рФВ, характеризующееся тем, что 95% олигомеров содержат от 6 до 20 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления композиция рФВ имеет

распределение олигомеров рФВ, характеризующееся тем, что 95% олигомеров имеют диапазон субъединиц, выбранный из вариантов с 458 по 641, приведенных в табл. 4.

Таблица 4

Примерные варианты распределения олигомеров рФВ, обнаруженных в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе

Субъединицы		Субъединицы		Субъединицы		Субъединицы	
2-40	Вар. 458	6-16	Вар. 504	12-20	Вар. 550	20-28	Вар. 596
2-38	Вар. 459	6-14	Вар. 505	12-18	Вар. 551	20-26	Вар. 597
2-36	Вар. 460	6-12	Вар. 506	12-16	Вар. 552	20-24	Вар. 598
2-34	Вар. 461	6-10	Вар. 507	12-14	Вар. 553	20-22	Вар. 599
2-32	Вар. 462	6-8	Вар. 508	14-40	Вар. 554	22-40	Вар. 600
2-30	Вар. 463	8-40	Вар. 509	14-38	Вар. 555	22-38	Вар. 601
2-28	Вар. 464	8-38	Вар. 510	14-36	Вар. 556	22-36	Вар. 602
2-26	Вар. 465	8-36	Вар. 511	14-34	Вар. 557	22-34	Вар. 603
2-24	Вар. 466	8-34	Вар. 512	14-32	Вар. 558	22-32	Вар. 604
2-22	Вар. 467	8-32	Вар. 513	14-30	Вар. 559	22-30	Вар. 605
2-20	Вар. 468	8-30	Вар. 514	14-28	Вар. 560	22-28	Вар. 606
2-18	Вар. 469	8-28	Вар. 515	14-26	Вар. 561	22-26	Вар. 607
2-16	Вар. 470	8-26	Вар. 516	14-24	Вар. 562	22-24	Вар. 608
2-14	Вар. 471	8-24	Вар. 517	14-22	Вар. 563	24-40	Вар. 609
2-12	Вар. 472	8-22	Вар. 518	14-20	Вар. 564	24-38	Вар. 610
2-10	Вар. 473	8-20	Вар. 519	14-18	Вар. 565	24-36	Вар. 611
2-8	Вар. 474	8-18	Вар. 520	14-16	Вар. 566	24-34	Вар. 612
4-40	Вар. 475	8-16	Вар. 521	16-40	Вар. 567	24-32	Вар. 613
4-38	Вар. 476	8-14	Вар. 522	16-38	Вар. 568	24-30	Вар. 614
4-36	Вар. 477	8-12	Вар. 523	16-36	Вар. 569	24-28	Вар. 615
4-34	Вар. 478	8-10	Вар. 524	16-34	Вар. 570	24-26	Вар. 616
4-32	Вар. 479	10-40	Вар. 525	16-32	Вар. 571	26-40	Вар. 617
4-30	Вар. 480	10-38	Вар. 526	16-30	Вар. 572	26-38	Вар. 618
4-28	Вар. 481	10-36	Вар. 527	16-28	Вар. 573	26-36	Вар. 619
4-26	Вар. 482	10-34	Вар. 528	16-26	Вар. 574	26-34	Вар. 620
4-24	Вар. 483	10-32	Вар. 529	16-24	Вар. 575	26-32	Вар. 621
4-22	Вар.	10-30	Вар.	16-22	Вар.	26-30	Вар.

	484		530		576		622
4-20	Вар. 485	10-28	Вар. 531	16-20	Вар. 577	26-28	Вар. 623
4-18	Вар. 486	10-26	Вар. 532	16-18	Вар. 578	28-40	Вар. 624
4-16	Вар. 487	10-24	Вар. 533	18-40	Вар. 579	28-38	Вар. 625
4-14	Вар. 488	10-22	Вар. 534	18-38	Вар. 580	28-36	Вар. 626
4-12	Вар. 489	10-20	Вар. 535	18-36	Вар. 581	28-34	Вар. 627
4-10	Вар. 490	10-18	Вар. 536	18-34	Вар. 582	28-32	Вар. 628
4-8	Вар. 491	10-16	Вар. 537	18-32	Вар. 583	28-30	Вар. 629
6-40	Вар. 492	10-14	Вар. 538	18-30	Вар. 584	30-40	Вар. 630
6-38	Вар. 493	10-12	Вар. 539	18-28	Вар. 585	30-38	Вар. 631
6-36	Вар. 494	12-40	Вар. 540	18-26	Вар. 586	30-36	Вар. 632
6-34	Вар. 495	12-38	Вар. 541	18-24	Вар. 587	30-34	Вар. 633
6-32	Вар. 496	12-36	Вар. 542	18-22	Вар. 588	30-32	Вар. 634
6-30	Вар. 497	12-34	Вар. 543	18-20	Вар. 589	32-40	Вар. 635
6-28	Вар. 498	12-32	Вар. 544	20-40	Вар. 590	32-38	Вар. 636
6-26	Вар. 499	12-30	Вар. 545	20-38	Вар. 591	32-36	Вар. 637
6-24	Вар. 500	12-28	Вар. 546	20-36	Вар. 592	32-34	Вар. 638
6-22	Вар. 501	12-26	Вар. 547	20-34	Вар. 593	34-40	Вар. 639
6-20	Вар. 502	12-24	Вар. 548	20-32	Вар. 594	36-38	Вар. 640
6-18	Вар. 503	12-22	Вар. 549	20-30	Вар. 595	38-40	Вар. 641

Вар. = Вариант.

В некоторых вариантах осуществления композиция рФВ, полученная способами, представленными в данном документе, может быть охарактеризована в соответствии с процентным содержанием молекул рФВ, которые присутствуют в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере. Например, в одном варианте осуществления по меньшей мере 20% молекул рФВ в композиции рФВ, используемой в способах, описанных в данном документе, присутствуют в олигомерном комплексе, состоящем из по меньшей мере 10 субъединиц. В другом варианте осуществления по меньшей мере 20% молекул рФВ в композиции рФВ, используемой в способах, описанных в данном документе, присутствуют в олигомерном комплексе, состоящем из по меньшей мере 12 субъединиц. В других вариантах осуществления композиция рФВ, используемая в способах, предложенных в данном документе, имеет минимальный процент (например, имеет по меньшей мере X %) молекул рФВ, присутствующих в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере (например, мультимере из по меньшей мере Y субъединиц) согласно любому из вариантов 134-457, приведенных в табл. 5-7.

Таблица 5

Иллюстративные варианты осуществления для процентного содержания молекул рФВ, которые присутствуют в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере, обнаруженном в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе

		Минимальное количество субъединиц в мультимере рФВ					
		6	8	10	12	14	16
Минимальный процент молекул рФВ	0%	Вар. 134	Вар. 152	Вар. 170	Вар. 188	Вар. 206	Вар. 224
	5%	Вар. 135	Вар. 153	Вар. 171	Вар. 189	Вар. 207	Вар. 225
	0%	Вар. 136	Вар. 154	Вар. 172	Вар. 190	Вар. 208	Вар. 226
	5%	Вар. 137	Вар. 155	Вар. 173	Вар. 191	Вар. 209	Вар. 227
	0%	Вар. 138	Вар. 156	Вар. 174	Вар. 192	Вар. 210	Вар. 228
	5%	Вар. 139	Вар. 157	Вар. 175	Вар. 193	Вар. 211	Вар. 229
	0%	Вар. 140	Вар. 158	Вар. 176	Вар. 194	Вар. 212	Вар. 230
	5%	Вар. 141	Вар. 159	Вар. 177	Вар. 195	Вар. 213	Вар. 231
	0%	Вар. 142	Вар. 160	Вар. 178	Вар. 196	Вар. 214	Вар. 232
	5%	Вар. 143	Вар. 161	Вар. 179	Вар. 197	Вар. 215	Вар. 233
	0%	Вар. 144	Вар. 162	Вар. 180	Вар. 198	Вар. 216	Вар. 234
	5%	Вар. 145	Вар. 163	Вар. 181	Вар. 199	Вар. 217	Вар. 235
	0%	Вар. 146	Вар. 164	Вар. 182	Вар. 200	Вар. 218	Вар. 236
	5%	Вар. 147	Вар. 165	Вар. 183	Вар. 201	Вар. 219	Вар. 237
	0%	Вар. 148	Вар. 166	Вар. 184	Вар. 202	Вар. 220	Вар. 238
	5%	Вар. 149	Вар. 167	Вар. 185	Вар. 203	Вар. 221	Вар. 239
	0%	Вар. 150	Вар. 168	Вар. 186	Вар. 204	Вар. 222	Вар. 240
	5%	Вар. 151	Вар. 169	Вар. 187	Вар. 205	Вар. 223	Вар. 241

Вар. = Вариант.

Таблица 6

Иллюстративные варианты осуществления процентного содержания молекул рФВ, которые присутствуют в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере, обнаруженном в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе

		Минимальное количество субъединиц в мультимере рФВ					
		18	20	22	24	26	28
Минимальный процент молекул рФВ	10%	Вар. 242	Вар. 260	Вар. 278	Вар. 296	Вар. 314	Вар. 332
	15%	Вар. 243	Вар. 261	Вар. 279	Вар. 297	Вар. 315	Вар. 333
	20%	Вар. 244	Вар. 262	Вар. 280	Вар. 298	Вар. 316	Вар. 334
	25%	Вар. 245	Вар. 263	Вар. 281	Вар. 299	Вар. 317	Вар. 335
	30%	Вар. 246	Вар. 264	Вар. 282	Вар. 300	Вар. 318	Вар. 336
	35%	Вар. 247	Вар. 265	Вар. 283	Вар. 301	Вар. 319	Вар. 337
	40%	Вар. 248	Вар. 266	Вар. 284	Вар. 302	Вар. 320	Вар. 338
	45%	Вар. 249	Вар. 267	Вар. 285	Вар. 303	Вар. 321	Вар. 339
	50%	Вар. 250	Вар. 268	Вар. 286	Вар. 304	Вар. 322	Вар. 340
	55%	Вар. 251	Вар. 269	Вар. 287	Вар. 305	Вар. 323	Вар. 341
	60%	Вар. 252	Вар. 270	Вар. 288	Вар. 306	Вар. 324	Вар. 342
	65%	Вар. 253	Вар. 271	Вар. 289	Вар. 307	Вар. 325	Вар. 343
	70%	Вар. 254	Вар. 272	Вар. 290	Вар. 308	Вар. 326	Вар. 344
	75%	Вар. 255	Вар. 273	Вар. 291	Вар. 309	Вар. 327	Вар. 345
	80%	Вар. 256	Вар. 274	Вар. 292	Вар. 310	Вар. 328	Вар. 346
	85%	Вар. 257	Вар. 275	Вар. 293	Вар. 311	Вар. 329	Вар. 347
90%	Вар. 258	Вар. 276	Вар. 294	Вар. 312	Вар. 330	Вар. 348	
95%	Вар. 259	Вар. 277	Вар. 295	Вар. 313	Вар. 331	Вар. 349	

Вар. = Вариант.

Таблица 7

Иллюстративные варианты осуществления для процентного содержания молекул рФВ, которые присутствуют в конкретном мультимере рФВ более высокого порядка или более крупном мультимере, обнаруженном в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе

		Минимальное количество субъединиц в мультимере рФВ					
		30	32	34	36	38	40
Минимальный процент молекул рФВ	10%	Вар. 350	Вар. 368	Вар. 386	Вар. 404	Вар. 422	Вар. 440
	15%	Вар. 351	Вар. 369	Вар. 387	Вар. 405	Вар. 423	Вар. 441
	20%	Вар. 352	Вар. 370	Вар. 388	Вар. 406	Вар. 424	Вар. 442
	25%	Вар. 353	Вар. 371	Вар. 389	Вар. 407	Вар. 425	Вар. 443
	30%	Вар. 354	Вар. 372	Вар. 390	Вар. 408	Вар. 426	Вар. 444
	35%	Вар. 355	Вар. 373	Вар. 391	Вар. 409	Вар. 427	Вар. 445
	40%	Вар. 356	Вар. 374	Вар. 392	Вар. 410	Вар. 428	Вар. 446
	45%	Вар. 357	Вар. 375	Вар. 393	Вар. 411	Вар. 429	Вар. 447
	50%	Вар. 358	Вар. 376	Вар. 394	Вар. 412	Вар. 430	Вар. 448
	55%	Вар. 359	Вар. 377	Вар. 395	Вар. 413	Вар. 431	Вар. 449
	60%	Вар. 360	Вар. 378	Вар. 396	Вар. 414	Вар. 432	Вар. 450
	65%	Вар. 361	Вар. 379	Вар. 397	Вар. 415	Вар. 433	Вар. 451
	70%	Вар. 362	Вар. 380	Вар. 398	Вар. 416	Вар. 434	Вар. 452
	75%	Вар. 363	Вар. 381	Вар. 399	Вар. 417	Вар. 435	Вар. 453
	80%	Вар. 364	Вар. 382	Вар. 400	Вар. 418	Вар. 436	Вар. 454
	85%	Вар. 365	Вар. 383	Вар. 401	Вар. 419	Вар. 437	Вар. 455
90%	Вар. 366	Вар. 384	Вар. 402	Вар. 420	Вар. 438	Вар. 456	
95%	Вар. 367	Вар. 385	Вар. 403	Вар. 421	Вар. 439	Вар. 457	

Вар. = Вариант.

В соответствии с вышеизложенным, рФВ содержит значительный процент высокомолекулярных (ВМ) мультимеров рФВ. В дополнительных вариантах осуществления композиция ВМ мультимеров рФВ содержит по меньшей мере 10-80% декамеров рФВ или мультимеров более высокого порядка. В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит около 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% декамеров или мультимеров более высокого порядка. В дополнительных вариантах осуществления композиция ВМ мультимеров рФВ содержит по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% декамеров или мультимеров более высокого порядка.

Оценка количества и процентного содержания мультимеров рФВ может быть проведена с использованием методов, известных в данной области техники, включая, без ограничения, методы с использованием электрофореза и методы эксклюзионной хроматографии для разделения мультимеров рФВ по размеру, например, как обсуждается в Cumming et al., (J Clin Pathol., 1993 May; 46(5): 470-473, который включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех рекомендаций, относящихся к оценке мультимеров рФВ). Такие методы могут дополнительно включать методы иммуноблоттинга (такие как вестерн-блоттинг), при которых гель подвергают иммуноблоттингу с помощью радиоактивно меченного антитела к ФВ с последующим хемиллюминесцентным обнаружением (см. например Wen et al., (1993), J. Clin. Lab. Anal., 7: 317-323, который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, относящихся к оценке мультимеров рФВ). Дополнительные анализы на ФВ включают анализ активности антигена ФВ (ФВ:Аг), ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:КР) и анализ коллагенсвязывающей активности ФВ (ФВ:КСА), которые часто используются для диагностики и классификации болезни фон Виллебранда (см., например, Favalloro et al., Pathology, 1997, 29(4): 341-456, который настоящим включен посредством ссылки в полном объеме для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с анализами на ФВ).

В некоторых вариантах осуществления соотношение прокоагулянтной активности rFVIII (МЕ rFVIII: С) к ристоцетин-кофакторной активности рФВ (МЕ рФВ: КР) для рФВ, полученного способами по данному изобретению, составляет от 3:1 до 1:5. В дополнительных вариантах осуществления соотношение составляет от 2:1 до 1:4. В других вариантах осуществления соотношение составляет от 5:2 до 1:4. В дополнительных вариантах осуществления соотношение составляет от 3:2 до 1:3. В других вариантах осуществления соотношение составляет около 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4 или 3:5. В дополнительных вариантах осуществления соотношение составляет от 1:1 до 1:2. В других вариантах осуществления соотношение составляет 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 или 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение прокоагулянтной активности rFVIII (МЕ rFVIII: С) к ристоцетин-кофакторной активности рФВ (МЕ рФВ: КР) в композиции, пригодной для способа, описанного в данном документе, выбрано из вариантов с 1988 по 2140, указанных в табл. 8.

Таблица 8

Иллюстративные варианты осуществления соотношения прокоагулянтной активности rFVIII (МЕ rFVIII: С) к ристоцетин-кофакторной активности рФВ (МЕ рФВ: КР) в композициях и используемых в способах, предложенных в данном документе

(МЕ rFVIII:С) к (МЕ рФВ:КР)		(МЕ rFVIII:С) к (МЕ рФВ:КР)		(МЕ rFVIII:С) к (МЕ рФВ:КР)		(МЕ rFVIII:С) к (МЕ рФВ:КР)	
4:1	Вар. 1988	3:1-3:5	Вар. 2027	4:3-1:4	Вар. 2065	4:5-2:3	Вар. 2103
3:1	Вар. 1989	3:1-2:3	Вар. 2028	4:3-1:3	Вар. 2066	4:5-3:4	Вар. 2104
2:1	Вар. 1990	3:1-3:4	Вар. 2029	4:3-2:5	Вар. 2067	3:4-1:6	Вар. 2105
3:2	Вар. 1991	3:1-4:5	Вар. 2030	4:3-1:2	Вар. 2068	3:4-1:5	Вар. 2106
4:3	Вар. 1992	3:1-5:6	Вар. 2031	4:3-3:5	Вар. 2069	3:4-1:4	Вар. 2107
1:1	Вар. 1993	3:1-1:1	Вар. 2032	4:3-2:3	Вар. 2070	3:4-1:3	Вар. 2108
5:6	Вар. 1994	3:1-4:3	Вар. 2033	4:3-3:4	Вар. 2071	3:4-2:5	Вар. 2109
4:5	Вар. 1995	3:1-3:2	Вар. 2034	4:3-4:5	Вар. 2072	3:4-1:2	Вар. 2110
3:4	Вар. 1996	3:1-2:1	Вар. 2035	4:3-5:6	Вар. 2073	3:4-3:5	Вар. 2111
2:3	Вар. 1997	2:1-1:6	Вар. 2036	4:3-1:1	Вар. 2074	3:4-2:3	Вар. 2112
3:5	Вар. 1998	2:1-1:5	Вар. 2037	1:1-1:6	Вар. 2075	2:3-1:6	Вар. 2113
1:2	Вар. 1999	2:1-1:4	Вар. 2038	1:1-1:5	Вар. 2076	2:3-1:5	Вар. 2114
2:5	Вар. 2000	2:1-1:3	Вар. 2039	1:1-1:4	Вар. 2077	2:3-1:4	Вар. 2115
1:3	Вар. 2001	2:1-2:5	Вар. 2040	1:1-1:3	Вар. 2078	2:3-1:3	Вар. 2116
1:4	Вар. 2002	2:1-1:2	Вар. 2041	1:1-2:5	Вар. 2079	2:3-2:5	Вар. 2117
1:5	Вар. 2003	2:1-3:5	Вар. 2042	1:1-1:2	Вар. 2080	2:3-1:2	Вар. 2118

1:6	Вар. 2004	2:1-2:3	Вар. 2043	1:1-3:5	Вар. 2081	2:3-3:5	Вар. 2119
4:1-1:6	Вар. 2005	2:1-3:4	Вар. 2044	1:1-2:3	Вар. 2082	3:5-1:6	Вар. 2120
4:1-1:5	Вар. 2006	2:1-4:5	Вар. 2045	1:1-3:4	Вар. 2083	3:5-1:5	Вар. 2121
4:1-1:4	Вар. 2007	2:1-5:6	Вар. 2046	1:1-4:5	Вар. 2084	3:5-1:4	Вар. 2122
4:1-1:3	Вар. 2008	2:1-1:1	Вар. 2047	1:1-5:6	Вар. 2085	3:5-1:3	Вар. 2123
4:1-2:5	Вар. 2009	2:1-4:3	Вар. 2048	5:6-1:6	Вар. 2086	3:5-2:5	Вар. 2124
4:1-1:2	Вар. 2010	2:1-3:2	Вар. 2049	5:6-1:5	Вар. 2087	3:5-1:2	Вар. 2125
4:1-3:5	Вар. 2011	3:2-1:6	Вар. 2050	5:6-1:4	Вар. 2088	1:2-1:6	Вар. 2126
4:1-2:3	Вар. 2012	3:2-1:5	Вар. 2051	5:6-1:3	Вар. 2089	1:2-1:5	Вар. 2127
4:1-3:4	Вар. 2013	3:2-1:4	Вар. 2052	5:6-2:5	Вар. 2090	1:2-1:4	Вар. 2128
4:1-4:5	Вар. 2014	3:2-1:3	Вар. 2053	5:6-1:2	Вар. 2091	1:2-1:3	Вар. 2129
4:1-5:6	Вар. 2015	3:2-2:5	Вар. 2054	5:6-3:5	Вар. 2092	1:2-2:5	Вар. 2130
4:1-1:1	Вар. 2016	3:2-1:2	Вар. 2055	5:6-2:3	Вар. 2093	2:5-1:6	Вар. 2131
4:1-4:3	Вар. 2017	3:2-3:5	Вар. 2056	5:6-3:4	Вар. 2094	2:5-1:5	Вар. 2132
4:1-3:2	Вар. 2018	3:2-2:3	Вар. 2057	5:6-4:5	Вар. 2095	2:5-1:4	Вар. 2133
4:1-2:1	Вар. 2019	3:2-3:4	Вар. 2058	4:5-1:6	Вар. 2096	2:5-1:3	Вар. 2134
4:1-3:1	Вар. 2020	3:2-4:5	Вар. 2059	4:5-1:5	Вар. 2097	1:3-1:6	Вар. 2135
3:1-1:6	Вар. 2021	3:2-5:6	Вар. 2060	4:5-1:4	Вар. 2098	1:3-1:5	Вар. 2136
3:1-1:5	Вар. 2022	3:2-1:1	Вар. 2061	4:5-1:3	Вар. 2099	1:3-1:4	Вар. 2137
3:1-1:4	Вар. 2023	3:2-4:3	Вар. 2062	4:5-2:5	Вар. 2100	1:4-1:6	Вар. 2138
3:1-1:3	Вар. 2024	4:3-1:6	Вар. 2063	4:5-1:2	Вар. 2101	1:4-1:5	Вар. 2139
3:1-2:5	Вар. 2025	4:3-1:5	Вар. 2064	4:5-3:5	Вар. 2102	1:5-1:6	Вар. 2140
3:1-1:2	Вар. 2026						

Вар. = Вариант.

В дополнительных вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка по данному изобретению стабильны в течение от около 1 до около 90 часов после введения. В других вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка стабильны в течение около 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 часов после введения. В других вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка стабильны в течение по меньшей мере 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления оценивается стабильность мультимеров рФВ *in vitro*.

В одном варианте осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка, используемые в композициях и способах, предложенных в данном документе, имеют период полужизни, составляющий по меньшей мере 12 часов после введения. В другом варианте осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка имеют период полужизни, составляющий по меньшей мере 24 часа после введения. В других вариантах осуществления мультимеры рФВ более высокого порядка имеют период полужизни, выбранный из вариантов с 642 по 1045, указанных в табл. 9.

Таблица 9

Примерные варианты осуществления периода полужизни мультимеров рФВ более высокого порядка, обнаруженные в композициях, полученных способами, предложенных в данном документе

Часы		Часы		Часы		Часы	
по меньшей мере 1	Вар. 642	4-22	Вар. 743	14-78	Вар. 844	24-30	Вар. 945
по меньшей мере 2	Вар. 643	4-20	Вар. 744	14-72	Вар. 845	24-27	Вар. 946
по меньшей мере 3	Вар. 644	4-18	Вар. 745	14-66	Вар. 846	27-90	Вар. 947
по меньшей мере 4	Вар. 645	4-16	Вар. 746	14-60	Вар. 847	27-84	Вар. 948
по меньшей мере 5	Вар. 646	4-14	Вар. 747	14-54	Вар. 848	27-78	Вар. 949
по меньшей мере 6	Вар. 647	4-12	Вар. 748	14-48	Вар. 849	27-72	Вар. 950
по меньшей мере 7	Вар. 648	4-10	Вар. 749	14-45	Вар. 850	27-66	Вар. 951
по меньшей мере 8	Вар. 649	4-8	Вар. 750	14-42	Вар. 851	27-60	Вар. 952
по меньшей мере 9	Вар. 650	4-6	Вар. 751	14-39	Вар. 852	27-54	Вар. 953
по меньшей мере 10	Вар. 651	6-90	Вар. 752	14-36	Вар. 853	27-48	Вар. 954
по меньшей мере	Вар. 652	6-84	Вар. 753	14-33	Вар. 854	30-90	Вар. 955

11							
по меньшей мере 12	Вар. 653	6-78	Вар. 754	14-30	Вар. 855	30-84	Вар. 956
по меньшей мере 14	Вар. 654	6-72	Вар. 755	14-27	Вар. 856	30-78	Вар. 957
по меньшей мере 16	Вар. 655	6-66	Вар. 756	14-24	Вар. 857	30-72	Вар. 958
по меньшей мере 18	Вар. 656	6-60	Вар. 757	14-22	Вар. 858	30-66	Вар. 959
по меньшей мере 20	Вар. 657	6-54	Вар. 758	14-20	Вар. 859	30-60	Вар. 960
по меньшей мере 22	Вар. 658	6-48	Вар. 759	14-18	Вар. 860	30-54	Вар. 961
по меньшей мере 24	Вар. 659	6-45	Вар. 760	14-16	Вар. 861	30-48	Вар. 962
по меньшей мере 27	Вар. 660	6-42	Вар. 761	16-90	Вар. 862	30-45	Вар. 963
по меньшей мере 30	Вар. 661	6-39	Вар. 762	16-84	Вар. 863	30-42	Вар. 964
по меньшей мере 33	Вар. 662	6-36	Вар. 763	16-78	Вар. 864	30-39	Вар. 965
по меньшей мере 36	Вар. 663	6-33	Вар. 764	16-72	Вар. 865	30-36	Вар. 966
по меньшей мере 39	Вар. 664	6-30	Вар. 765	16-66	Вар. 866	30-33	Вар. 967
по меньшей мере 42	Вар. 665	6-27	Вар. 766	16-60	Вар. 867	33-90	Вар. 968
по меньшей мере 45	Вар. 666	6-24	Вар. 767	16-54	Вар. 868	33-84	Вар. 969
по меньшей мере 48	Вар. 667	6-22	Вар. 768	16-48	Вар. 869	33-78	Вар. 970
по меньшей мере 54	Вар. 668	6-20	Вар. 769	16-45	Вар. 870	33-72	Вар. 971
по меньшей мере 60	Вар. 669	6-18	Вар. 770	16-42	Вар. 871	33-66	Вар. 972
по меньшей мере 66	Вар. 670	6-16	Вар. 771	16-39	Вар. 872	33-60	Вар. 973
по меньшей мере 72	Вар. 671	6-14	Вар. 772	16-36	Вар. 873	33-54	Вар. 974
по меньшей мере 78	Вар. 672	6-12	Вар. 773	16-33	Вар. 874	33-48	Вар. 975
по меньшей мере 84	Вар. 673	6-10	Вар. 774	16-30	Вар. 875	33-45	Вар. 976
по меньшей мере 90	Вар. 674	6-8	Вар. 775	16-27	Вар. 876	33-42	Вар. 977
2-90	Вар. 675	8-90	Вар. 776	16-24	Вар. 877	33-29	Вар. 978
2-84	Вар. 676	8-84	Вар. 777	16-22	Вар. 878	33-36	Вар. 979
2-78	Вар. 677	8-78	Вар. 778	16-20	Вар. 879	36-90	Вар. 980
2-72	Вар. 678	8-72	Вар. 779	16-18	Вар. 880	36-84	Вар. 981
2-66	Вар. 679	8-66	Вар. 780	18-90	Вар. 881	36-78	Вар. 982
2-60	Вар. 680	8-60	Вар. 781	18-84	Вар. 882	36-72	Вар. 983
2-54	Вар. 681	8-54	Вар. 782	18-78	Вар. 883	36-66	Вар. 984
2-48	Вар. 682	8-48	Вар. 783	18-72	Вар. 884	36-60	Вар. 985
2-45	Вар. 683	8-45	Вар. 784	18-66	Вар. 885	36-54	Вар. 986
2-42	Вар. 684	8-42	Вар. 785	18-60	Вар. 886	36-48	Вар. 987
2-39	Вар. 685	8-39	Вар. 786	18-54	Вар. 887	36-45	Вар. 988
2-36	Вар. 686	8-36	Вар. 787	18-48	Вар. 888	36-42	Вар. 989

2-33	Bap. 687	8-33	Bap. 788	18-45	Bap. 889	36-39	Bap. 990
2-30	Bap. 688	8-30	Bap. 789	18-42	Bap. 890	39-90	Bap. 991
2-27	Bap. 689	8-27	Bap. 790	18-39	Bap. 891	39-84	Bap. 992
2-24	Bap. 690	8-24	Bap. 791	18-36	Bap. 892	39-78	Bap. 993
2-22	Bap. 691	8-22	Bap. 792	18-33	Bap. 893	39-72	Bap. 994
2-20	Bap. 692	8-20	Bap. 793	18-30	Bap. 894	39-66	Bap. 995
2-18	Bap. 693	8-18	Bap. 794	18-27	Bap. 895	39-60	Bap. 996
2-16	Bap. 694	8-16	Bap. 795	18-24	Bap. 896	39-54	Bap. 997
2-14	Bap. 695	8-14	Bap. 796	18-22	Bap. 897	39-48	Bap. 998
2-12	Bap. 696	8-12	Bap. 797	18-20	Bap. 898	39-45	Bap. 999
2-10	Bap. 697	8-10	Bap. 798	20-90	Bap. 899	39-42	Bap. 1000
2-8	Bap. 698	10-90	Bap. 799	20-84	Bap. 900	42-90	Bap. 1001
2-6	Bap. 699	10-84	Bap. 800	20-78	Bap. 901	42-84	Bap. 1002
2-4	Bap. 700	10-78	Bap. 801	20-72	Bap. 902	42-78	Bap. 1003
3-90	Bap. 701	10-72	Bap. 802	20-66	Bap. 903	42-72	Bap. 1004
3-84	Bap. 702	10-66	Bap. 803	20-60	Bap. 904	42-66	Bap. 1005
3-78	Bap. 703	10-60	Bap. 804	20-54	Bap. 905	42-60	Bap. 1006
3-72	Bap. 704	10-54	Bap. 805	20-48	Bap. 906	42-54	Bap. 1007
3-66	Bap. 705	10-48	Bap. 806	20-45	Bap. 907	42-48	Bap. 1008
3-60	Bap. 706	10-45	Bap. 807	20-42	Bap. 908	42-45	Bap. 1009
3-54	Bap. 707	10-42	Bap. 808	20-39	Bap. 909	45-90	Bap. 1010
3-48	Bap. 708	10-39	Bap. 809	20-36	Bap. 910	45-84	Bap. 1011
3-45	Bap. 709	10-36	Bap. 810	20-33	Bap. 911	45-78	Bap. 1012
3-42	Bap. 710	10-33	Bap. 811	20-30	Bap. 912	45-72	Bap. 1013
3-39	Bap. 711	10-30	Bap. 812	20-27	Bap. 913	45-66	Bap. 1014
3-36	Bap. 712	10-27	Bap. 813	20-24	Bap. 914	45-60	Bap. 1015
3-33	Bap. 713	10-24	Bap. 814	20-22	Bap. 915	45-54	Bap. 1016
3-30	Bap. 714	10-22	Bap. 815	22-90	Bap. 916	45-48	Bap. 1017
3-27	Bap. 715	10-20	Bap. 816	22-84	Bap. 917	48-90	Bap. 1018
3-24	Bap. 716	10-18	Bap. 817	22-78	Bap. 918	48-84	Bap. 1019
3-22	Bap. 717	10-16	Bap. 818	22-72	Bap. 919	48-78	Bap. 1020
3-20	Bap. 718	10-14	Bap. 819	22-66	Bap. 920	48-72	Bap. 1021
3-18	Bap. 719	10-12	Bap. 820	22-60	Bap. 921	48-66	Bap. 1022
3-16	Bap. 720	12-90	Bap. 821	22-54	Bap. 922	48-60	Bap. 1023
3-14	Bap. 721	12-84	Bap. 822	22-48	Bap. 923	48-54	Bap. 1024
3-12	Bap. 722	12-78	Bap. 823	22-45	Bap. 924	54-90	Bap. 1025
3-10	Bap. 723	12-72	Bap. 824	22-42	Bap. 925	54-84	Bap. 1026
3-8	Bap. 724	12-66	Bap. 825	22-39	Bap. 926	54-78	Bap. 1027
3-6	Bap. 725	12-60	Bap. 826	22-36	Bap. 927	54-72	Bap. 1028
3-4	Bap. 726	12-54	Bap. 827	22-33	Bap. 928	54-66	Bap. 1029
4-90	Bap. 727	12-48	Bap. 828	22-30	Bap. 929	54-60	Bap. 1030
4-84	Bap. 728	12-45	Bap. 829	22-27	Bap. 930	60-90	Bap. 1031
4-78	Bap. 729	12-42	Bap. 830	22-24	Bap. 931	60-84	Bap. 1032
4-72	Bap. 730	12-39	Bap. 831	24-90	Bap. 932	60-78	Bap. 1033
4-66	Bap. 731	12-36	Bap. 832	24-84	Bap. 933	60-72	Bap. 1034
4-60	Bap. 732	12-33	Bap. 833	24-78	Bap. 934	60-66	Bap. 1035
4-54	Bap. 733	12-30	Bap. 834	24-72	Bap. 935	66-90	Bap. 1036
4-48	Bap. 734	12-27	Bap. 835	24-66	Bap. 936	66-84	Bap. 1037

4-45	Вар. 735	12-24	Вар. 836	24-60	Вар. 937	66-78	Вар. 1038
4-42	Вар. 736	12-22	Вар. 837	24-54	Вар. 938	66-72	Вар. 1039
4-39	Вар. 737	12-20	Вар. 838	24-48	Вар. 939	72-90	Вар. 1040
4-36	Вар. 738	12-18	Вар. 839	24-45	Вар. 940	72-84	Вар. 1041
4-33	Вар. 739	12-16	Вар. 840	24-42	Вар. 941	72-78	Вар. 1042
4-30	Вар. 740	12-14	Вар. 841	24-39	Вар. 942	78-90	Вар. 1043
4-27	Вар. 741	14-90	Вар. 842	24-36	Вар. 943	78-84	Вар. 1044
4-24	Вар. 742	14-84	Вар. 843	24-33	Вар. 944	84-90	Вар. 1045

Вар. = Вариант.

В некоторых вариантах осуществления про-ФВ и/или очищенный рФВ, очищенный в соответствии с данным изобретением, не модифицирован никакими модификациями конъюгации, посттрансляцией или ковалентными модификациями. В конкретных вариантах осуществления про-ФВ и/или очищенный рФВ по данному изобретению не модифицирован водорастворимым полимером, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, гидроксилэтилкрахмал, полиуглеводный фрагмент и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления про-ФВ и/или очищенный рФВ, очищенный в соответствии с данным изобретением, модифицирован посредством конъюгации, посттрансляционной модификации или ковалентной модификации, включая модификации N- или C-концевых остатков, а также модификации выбранных боковых цепей, например, у свободных сульфгидрильных групп, первичных аминов и гидроксильных групп. В одном варианте осуществления водорастворимый полимер связан с белком (напрямую или через линкер) лизиновой группой или другим первичным амином. В некоторых вариантах осуществления про-ФВ и/или очищенный рФВ по данному изобретению может быть модифицирован путем конъюгации с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, гидроксилэтилкрахмал, полиуглеводный фрагмент и тому подобное.

Водорастворимые полимеры, которые можно использовать для модификации про-ФВ и/или очищенного рФВ, включают линейные и разветвленные структуры. Конъюгированные полимеры могут быть присоединены непосредственно к белкам коагуляции по изобретению или, альтернативно, могут быть присоединены через связывающий фрагмент. Неограничивающие примеры конъюгации белков с водорастворимыми полимерами можно найти в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 и 4179337, а также в Abuchowski and Davis "Enzymes as Drugs", Holcenberg and Roberts, Eds., pp. 367-383, John Wiley and Sons, New York (1981), и Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008.

Конъюгация белков может быть выполнена с помощью ряда хорошо известных в данной области техники методов, например, см. Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008. Примеры включают связь через пептидную связь между карбоксильной группой на одном из белков коагуляции или водорастворимого полимерного фрагмента и аминогруппой другого, или сложноэфирную связь между карбоксильной группой одного и гидроксильной группой другого. Другая связь, с помощью которой белок коагуляции по данному изобретению может быть конъюгирован с водорастворимым полимерным соединением, осуществляется через основание Шиффа между свободной аминогруппой на полимерной части, которая реагирует с альдегидной группой, образованной на невосстанавливаемом конце полимера при помощи окисления периодам (Jennings and Lugowski, J. Immunol. 1981; 127:1011-8; Femandes and Gregonadis, Biochim Biophys Acta. 1997; 1341; 26-34). Образовавшееся основание Шиффа можно стабилизировать специфическим восстановлением с помощью NaCNBH_3 с образованием вторичного амина. Альтернативным подходом является получение концевых свободных аминогрупп на полимере путем восстановительного аминирования с NH_4Cl после предварительного окисления. Бифункциональные реагенты можно использовать для связывания двух амино или двух гидроксильных групп. Например, полимер, содержащий аминогруппу, может быть связан с аминогруппой белка коагуляции с помощью таких реагентов, как BS3 (бис(сульфосукцинимидил)себерат/Pierce, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США). Кроме того, гетеробифункциональные сшивающие реагенты, такие как сульфо-EMCS (N-ε-малеимидокапроилокси) сложный эфир сульфосукцинимидила/Pierce), могут быть использованы, например, для связывания аминовых и тиоловых групп. В других вариантах осуществления группа, реагирующая с альдегидом, такая как алкоксид ПЭГ плюс диэтилацеталь бромацетальдегида; ПЭГ плюс ДМСО и уксусный ангидрид, а также ПЭГ хлорид плюс феноксид 4-гидроксибензальдегида, суццинимидиловые активные сложные эфиры, активированный дитиокарбонатный ПЭГ, 2,4,5-трихлорфенилхлорформиат и П-нитрофенилхлорформиат, активированный ПЭГ, могут быть использованы в конъюгации коагуляционного белка.

Другой метод измерения биологической активности ФВ представляет собой анализ связывания коллагена, основанный на технологии ИФА (Brown and Bosak, Thromb. Res., 1986, 43:303-311; Favaloro,

Thromb. Haemost., 2000, 83 127-135). Планшет для микротитрования покрывают коллагеном I или III типа. Затем ФВ связывают с коллагеновой поверхностью и впоследствии детектируют при помощи поликлонального антитела, меченного ферментом. Последняя стадия представляет собой реакцию с субстратом, которую можно фотометрически фиксировать с помощью считывающего устройства ИФА.

Иммунологические анализы факторов фон Виллебранда (ФВ: Аг) представляет собой иммуноанализы, при помощи которых измеряют концентрацию белка ФВ в плазме. Они не определяют функцию ФВ. Существует ряд методов измерения ФВ: Аг, включая как иммуноферментный анализ (ИФА), так и автоматизированный иммуноферментный анализ (ИИА). Многие лаборатории в настоящее время используют полностью автоматический иммуноферментный анализ. Исторически лаборатории использовали различные методы, включая электроиммуноанализ Laurell "Laurell Rockets", но сегодня они редко используются в большинстве лабораторий.

Наборы.

В качестве дополнительного аспекта изобретение включает наборы, которые содержат одну или более лиофилизированных композиций, упакованных таким образом, чтобы облегчить их применение для введения субъектам. В одном варианте осуществления такой набор содержит фармацевтический состав, описанный в данном документе (например, композицию, содержащую терапевтический белок или пептид), упакованный в контейнер, такой как герметичная бутылка или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или включенный в упаковку, которая описывает использование соединения или композиции при применении способа. В одном варианте осуществления фармацевтический состав упакован в контейнер так, что количество свободного пространства в контейнере (например, количество воздуха между жидким составом и верхом контейнера) очень мало. Предпочтительно, чтобы количество свободного пространства было незначительным (например, почти нулевым). В одном варианте осуществления набор содержит первый контейнер, содержащий терапевтическую белковую или пептидную композицию, и второй контейнер, содержащий физиологически приемлемый раствор для восстановления композиции. В одном аспекте фармацевтический состав упакован в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно содержать устройство, подходящее для введения фармацевтического состава в соответствии с конкретным путем введения. Предпочтительно набор содержит этикетку, на которой описывается использование фармацевтических составов.

рФВ для способов профилактического лечения спонтанных кровотечений у пациентов с тяжелой формой БВ.

Одним из преимуществ введения рФВ субъектам с тяжелой формой БВ для профилактического лечения эпизодов спонтанного кровотечения является то, что более высокая специфическая активность рФВ по сравнению с пФВ позволяет гибко подходить к количеству вводимого рФВ и числу повторных доз. Как будет понятно и более подробно описано в данном документе, совместно вводимый FVIII может быть рекомбинантным или полученным из плазмы.

Однократное или многократное введение рФВ проводят с уровнем доз и характером доз, которые выбирает лечащий врач. Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка зависит от типа заболевания, которое подлежит лечению, (например, болезни фон Виллебранда), степени тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли лекарственное средство в профилактических или терапевтических целях, от предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на лекарственное средство, и на усмотрение лечащего врача.

В некоторых аспектах рФВ вводят субъекту профилактически в дозе от 40 до 80 МЕ/кг, например, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 40-80, 45-80, 50-80, 45-70, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, 60-65, 55-65, 60-70, 65-70, 60-75, 70-80, или 75-80 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет от 45 МЕ/кг до 55 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет около 40 МЕ/кг, около 50 МЕ/кг или около 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет около 50 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет около 80 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю или более. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю в дозе от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю в дозе от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг путем внутривенной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления образцы крови для измерения уровней активности ФВ:Аг, ФВ:КР, ФВ:СВ и FVIII были взяты до инфузии лекарственного средства, через 15 минут, 30 минут и 60 минут после введения дозы, а также через 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 28 часов, 32 часа, 48 часов, 72 часа и 96 часов. В некоторых вариантах осуществления образцы, включая, например, образцы крови, могут быть получены для оценки активности ФВ:КР и FVIII. В некоторых вариантах осуществления образцы для определения активности FVIII, FVIII:С, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают до профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:С, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают

через 15 минут, 30 минут, 60 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 28 часов, 32 часа, 48 часов, 72 часа или 96 часов после профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 25-31 день после профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для определения активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают после эпизода кровотечения, и в таких вариантах осуществления образец берут до введения рФВ, через 2 часа после введения и затем каждые 12-24 часа до разрешения кровотечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения на основе образцов определяют активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ в зависимости от времени. В некоторых вариантах осуществления FVIII:C также измеряют с помощью 1-стадийного анализа свертывания крови в зависимости от времени.

В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту в дозе 40-80 МЕ/кг, например, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 40-80, 45-80, 50-80, 45-70, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, 60-65, 55-65, 60-70, 65-70, 60-75, 70-80, или 75-80 МЕ/кг в качестве начального (первого) введения. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту в дозе 40-80 МЕ/кг, например, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 40-80, 45-80, 50-80, 45-70, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, 60-65, 55-65, 60-70, 65-70, 60-75, 70-80, или 75-80 МЕ/кг в качестве второго введения. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту в дозе 40-80 МЕ/кг, например, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 40-80, 45-80, 50-80, 45-70, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, 60-65, 55-65, 60-70, 65-70, 60-75, 70-80, или 75-80 МЕ/кг в качестве третьего введения. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту в дозе 40-80 МЕ/кг, например, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 40-80, 45-80, 50-80, 45-70, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, 60-65, 55-65, 60-70, 65-70, 60-75, 70-80, или 75-80 МЕ/кг в качестве последующего введения.

Композиции рФВ могут содержаться в фармацевтических составах, как описано в данном документе. Такие составы можно вводить перорально, местно, трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или путем внутривенной инъекции. Используемый в данном документе термин "парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные инъекции или методы инфузии. Также рассматривается введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрааммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретный участок. Обычно композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

В одном аспекте составы по данному изобретению вводят путем начального болюсного введения с последующей непрерывной инфузией для поддержания терапевтических уровней лекарственного препарата в крови. В качестве другого примера соединение по изобретению вводят в виде однократной дозы. Специалисты в данной области техники легко оптимизируют эффективные дозировки и режимы введения, определяемые надлежащей медицинской практикой и клиническим состоянием отдельного пациента. Путь введения может быть, но не ограничивается этим, внутривенным, внутрибрюшинным, подкожным или внутримышечным. Частота дозирования зависит от фармакокинетических параметров агентов и способа введения. Оптимальный фармацевтический состав определяется специалистом в данной области техники в зависимости от пути введения и желаемой дозировки. Например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 стр. 1435-1712, раскрытие которого настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с составами, путями введения и дозировками для фармацевтических продуктов. Такие составы влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения вводимых агентов *in vivo*. В зависимости от пути введения подходящая доза рассчитывается в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размером органа. Подходящие дозы могут быть установлены с помощью общепринятых анализов для определения доз в крови в сочетании с соответствующими данными доза-реакция. Окончательную схему лечения определяет лечащий врач с учетом различных факторов, которые изменяют действие лекарственных средств, например, специфическую активность лекарственного средства, тяжесть повреждения и реакцию пациента, возраст, состояние, массу тела, пол и диету пациента, степень тяжести инфекции, время введения и другие клинические факторы. Например, типичная доза рекомбинантного ФВ по данному изобретению составляет приблизительно 50 Ед/кг, что равно 500 мкг/кг. По мере проведения исследований будет появляться дополнительная информация относительно соответствующих уровней дозировки и продолжительности лечения различных заболеваний и патологических состояний.

Для введения композиций человеку или подопытным животным в одном аспекте композиции содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фразы "фармацевтически" или "фармакологически" приемлемые относятся к молекулярным объектам и композициям, которые являются ста-

бильными, ингибируют деградацию белка, такую как продукты агрегации и расщепления, и, кроме того, не вызывают аллергических или других побочных реакций при введении с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, как описано ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые и все клинически применимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и фунгицидные агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное, включая агенты, описанные выше.

Фармацевтические составы вводят перорально, местно, трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или путем внутривенной инъекции. Используемый в данном документе термин "парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интрацестеральные инъекции или методы инфузии. Также рассматривается введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, внутрикожной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной и/или внутрилегочной инъекции в конкретный участок. Обычно композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

Однократное или многократное введение рФВ проводят с уровнем доз и характером доз, которые выбирает лечащий врач. Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка зависит от типа заболевания, которое подлежит лечению, (например, болезни фон Виллебранда), степени тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли лекарство в профилактических или терапевтических целях, от предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на лекарственное средство, и на усмотрение лечащего врача.

Лиофилизированные составы ФВ.

Настоящий способ также обеспечивает составы рФВ для применения в способах лечения, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция рФВ используется для производства фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рФВ может быть включен в лиофилизированный состав.

В некоторых вариантах осуществления составы, содержащие полипептид ФВ по изобретению, лиофилизируют после очистки и перед введением субъекту. Лиофилизация проводится с использованием общепринятых в данной области методов и должна быть оптимизирована для разрабатываемой композиции (Tang et al., *Pharm Res.* 21:191-200, (2004) и Chang et al., *Pharm Res.* 13:243-9 (1996)).

Цикл лиофилизации, в одном аспекте, состоит из трех стадий: замораживания, первичной сушки и вторичной сушки (A. P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)). На стадии замораживания раствор охлаждают, чтобы вызвать образование льда. Кроме того, эта стадия вызывает кристаллизацию объемобразующего агента. Лед сублимируется на стадии первичной сушки, которая проводится путем снижения давления в камере ниже давления пара льда, с использованием вакуума и подвода тепла для ускорения сублимации. Наконец, адсорбированная или связанная вода удаляется на стадии вторичной сушки при пониженном давлении в камере и при повышенной температуре полки. В результате получается материал, известный как лиофилизированная лепешка. После этого лепешку можно восстановить стерильной водой или подходящим растворителем для инъекций.

Цикл лиофилизации не только определяет конечное физическое состояние эксципиентов, но также влияет на другие параметры, такие как время восстановления, внешний вид, стабильность и конечное содержание влаги. Структура композиции в замороженном состоянии проходит через несколько переходов (например, стеклование, смачивание и кристаллизация), которые происходят при определенных температурах, и эту структуру можно использовать для понимания и оптимизации процесса лиофилизации. Температура стеклования (T_g и/или T_g') может предоставить информацию о физическом состоянии растворенного вещества и может быть определена с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). T_g и T_g' являются важным параметром, который необходимо учитывать при разработке цикла лиофилизации. Например, T_g' важна для первичной сушки. Кроме того, в высушенном состоянии температура стеклования дает информацию о температуре хранения конечного продукта.

Фармацевтические составы и эксципиенты в целом.

Эксципиенты представляют собой добавки, которые либо придают, либо улучшают стабильность и доставку лекарственного препарата (например, белка). Независимо от причины их включения, эксципиенты являются неотъемлемым компонентом препарата и поэтому должны быть безопасными и хорошо переноситься пациентами. Для белковых препаратов выбор эксципиентов особенно важен, поскольку они могут влиять как на эффективность, так и на иммуногенность препарата. Следовательно, белковые составы необходимо разрабатывать с соответствующим выбором эксципиентов, которые обеспечивают подходящую стабильность, безопасность и конкурентоспособность.

Лиофилизированный состав, в одном аспекте, по меньшей мере, состоит из одного или более из буфера, объемобразующего агента и стабилизатора. В этом аспекте полезность поверхностно-активного вещества оценивают и выбирают в случаях, когда агрегация во время стадии лиофилизации или во время восстановления становится проблемой. Соответствующий буферный агент включен для поддержания состава в стабильных пределах pH во время лиофилизации. Сравнение компонентов эксципиента, предусмотренных для жидких и лиофилизированных белковых составах, представлено в табл. 10.

Таблица 10

Вспомогательные компоненты лиофилизированных белковых составов

Вспомогательный компонент	Функция в лиофилизированном составе
Буфер	Поддерживать pH состава во время лиофилизации и после восстановления
Регулирующий тоничность агент/стабилизатор	Стабилизаторы включают крио- и лиопротекторы Примеры включают полиолы, сахара и полимеры Криопротекторы защищают белки от холодных стрессов Леопротекторы стабилизируют белки в лиофилизированном состоянии
Структурообразующее средство	Используется для придания изделию элегантности и предотвращения разрыва Обеспечивает структурную прочность лиофилизированной лепешки Примеры включают маннитол и глицин
Поверхностно-активное вещество	Используется, если агрегация в процессе лиофилизации является проблемой Может служить для сокращения времени восстановления Примеры включают полисорбат 20 и 80
Антиоксидант	Как правило, не используются, молекулярные реакции в лиофилизированной лепешке обычно замедляются
Ионы металлов/хелатирующий агент	Может быть включен, если конкретный ион металла включен только в качестве кофактора в тех случаях, когда металл необходим для протеазной активности Хелатирующие агенты, как правило, не требуются в лиофилизированных составах
Консервант	Только для многодозовых составов Обеспечивает защиту от роста микроорганизмов в составе Как правило, входит в состав разбавителя для восстановления (например, bWFI)

Основной задачей при разработке белковых составов является стабилизация продукта против стрессов, связанных с производством, транспортировкой и хранением. Роль эксципиента в составе заключается в обеспечении стабилизации против этих стрессов. Эксципиенты также используются для снижения вязкости белковых составов с высокой концентрацией, чтобы обеспечить их доставку и повысить удобство для пациента. В целом, эксципиенты можно классифицировать на основе механизмов, с помощью которых они стабилизируют белки против различных химических и физических стрессов. Некоторые эксципиенты используются для смягчения последствий определенного стресса или для регулирования определенной восприимчивости к определенному белку. Другие эксципиенты оказывают более общее влияние на физическую и ковалентную стабильность белков. Описанные в данном документе эксципиенты сгруппированы по химическому типу или функциональной роли в составах. Краткое описание режимов стабилизации приводится при обсуждении каждого типа эксципиента.

С учетом представленных в данном документе идей и руководящих указаний, специалисты в данной области техники будут знать, какое количество или диапазон эксципиента может быть включено в любой конкретный состав для получения биофармацевтического состава по изобретению, который способствует сохранению стабильности биофармацевтического препарата (например, белка). Например, количество и тип соли, которая должна быть включена в биофармацевтический состав по данному изобретению, выбирается на основе желаемой осмоляльности (например, изотонической, гипотонической или гипертонической) конечного раствора, а также количества и осмоляльности других компонентов для включения в состав.

Например, включение примерно 5% сорбита может обеспечить изотоничность, в то время как примерно 9% вспомогательного вещества сахарозы необходимо для достижения изотоничности. Выбор количества или диапазона концентраций одного или более эксципиентов, которые могут быть включены в биофармацевтический состав по данному изобретению, был проиллюстрирован выше со ссылкой на соли, полиолы и сахара. Однако специалисты в данной области техники поймут, что соображения, описанные в данном документе и дополнительно проиллюстрированные ссылкой на конкретные эксципиенты, в равной степени применимы ко всем типам и комбинациям эксципиентов, включая, например, соли, аминокислоты, другие агенты тоничности, поверхностно-активные вещества, стабилизаторы, объемобразующие агенты, криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, ионы металлов, хелатирующие агенты и/или консерванты.

Кроме того, если конкретный эксципиент указан в молярной концентрации, специалисты в данной области техники поймут, что также рассматривается эквивалентный процент раствора (% мас./об. (на-

пример, (граммы вещества в образце раствора/мл раствора) x 100%).

Конечно, специалист в данной области техники поймет, что концентрации описанных в данном документе эксципиентов имеют взаимозависимость в пределах конкретного состава. Например, концентрация объемообразующего агента может быть снижена там, где, например, имеется высокая концентрация белка или когда, например, имеется высокая концентрация стабилизирующего агента. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что для поддержания изотоничности конкретного состава, в котором нет объемообразующего агента, концентрация стабилизирующего агента должна быть скорректирована соответствующим образом (например, будет использовано "тонизирующее" количество стабилизатора). Общие эксципиенты известны в данной области техники и могут быть найдены в Powell et al., *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311.

Фармацевтические буферы и буферные агенты.

Обычно наблюдается максимальная стабильность фармакологически активного белкового состава в узком диапазоне pH. Этот диапазон pH оптимальной стабильности должен быть определен на раннем этапе исследований перед приготовлением состава. Несколько подходов, таких как ускоренные исследования стабильности и калориметрические скрининговые исследования, полезны в этих задачах (Remmele R.L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). После того, как состав готов, белок должен производиться и сохраняться в течение всего срока его хранения. Следовательно, буферные агенты почти всегда используются для контроля pH в составе.

Буферная емкость буферных веществ максимальна при pH, равном pKa, и уменьшается по мере увеличения или уменьшения pH от этого значения. Девяносто процентов буферной емкости находится в пределах одной единицы pH от его pKa. Емкость буфера также увеличивается пропорционально увеличению концентрации буфера.

При выборе буфера необходимо учитывать несколько факторов. Прежде всего, необходимо определить вид буфера и его концентрацию на основе его pKa и желаемого pH препарата. Не менее важно убедиться, что буфер совместим с белком и другими эксципиентами композиции и не катализирует какие-либо реакции деградации. Третий важный аспект, который следует учитывать, - это ощущение покалывания и раздражения, которое буфер может вызвать при введении. Например, известно, что цитрат вызывает покалывание при инъекции (Laursen T, et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). Потенциал покалывания и раздражения выше для лекарственных средств, которые вводятся подкожным (п/к) или внутримышечным (в/м) путями, когда раствор лекарственного средства остается на месте в течение относительно более длительного периода времени, чем при внутривенном введении, когда состав быстро растворяется в крови при введении. Для составов, которые вводятся путем прямой внутривенной инфузии, необходимо контролировать общее количество буфера (и любого другого компонента состава). Следует быть особенно осторожным с ионами калия, вводимыми в форме калий-фосфатного буфера, которые могут вызывать сердечно-сосудистые эффекты у пациента (Hollander-Rodriguez JC, et al., *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006)).

Буферы для лиофилизированных составов требуют дополнительного рассмотрения. Некоторые буферы, такие как фосфат натрия, могут кристаллизоваться из аморфной фазы белка во время замораживания, что приводит к сдвигу pH. Другие распространенные буферы, такие как ацетат и имидазол, могут сублимироваться или испаряться во время процесса лиофилизации, тем самым изменяя pH композиции во время лиофилизации или после восстановления.

Буферная система, присутствующая в композициях, выбирается так, чтобы быть физиологически совместимой и поддерживать желаемый pH фармацевтического состава. В одном варианте осуществления pH раствора находится между pH 2,0 и pH 12,0. Например, pH раствора может быть 2,0, 2,3, 2,5, 2,7, 3,0, 3,3, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7, 9,0, 9,3, 9,5, 9,7, 10,0, 10,3, 10,5, 10,7, 11,0, 11,3, 11,5, 11,7 или 12,0.

Буферное соединение для контроля pH может присутствовать в любом количестве, подходящем для поддержания pH композиции на заданном уровне. В одном варианте осуществления концентрация соединения для контроля pH составляет от 0,1 мМ до 500 мМ (1 М). Например, предполагается, что концентрация соединения для контроля pH составляет по меньшей мере 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или 500 мМ.

Примеры агентов для контроля pH, используемых для буферизации состава, изложенные в данном документе, включают, без ограничения, органические кислоты, глицин, гистидин, глутамат, сукцинат, фосфат, ацетат, цитрат, трис, HEPES и аминокислоты или смеси аминокислот, включая, без ограничения, аспарат, гистидин и глицин. В одном варианте осуществления настоящего изобретения буферный агент представляет собой цитрат.

Фармацевтические стабилизаторы и объемообразующие агенты.

В одном аспекте данных фармацевтических составов стабилизатор (или комбинация стабилизаторов) добавляют для предотвращения или уменьшения агрегации и химического разложения, вызванных хранением. Мутный или непрозрачный раствор после восстановления указывает на то, что белок выпал в осадок или, по меньшей мере, агрегировал. Термин "стабилизатор" означает эксципиент, способный предотвращать агрегацию или физическое разложение, включая химическое разложение (например, автолиз,

дезамидирование, окисление и т.д.) в водном состоянии. Предполагаемые стабилизаторы включают, без ограничения, сахарозу, трегалозу, маннозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, раффинозу, целлобиозу, гентиобиозу, изомальтозу, арабинозу, глюкозамин, фруктозу, маннит, сорбит, глицин, аргинин HCL, полигидрокси соединения, включая полисахариды, такие как декстран, крахмал, гидроксипроцеллоза, циклодекстрины, N-метилпирролиден, целлюлозу и гиалуроновую кислоту, хлорид натрия (Carpenter et al., *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)). В данные составы стабилизатор включен в концентрации около 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 или 1000 мМ. В одном из вариантов настоящего изобретения маннит и трегалоза используются в качестве стабилизирующих агентов.

Если желательно, составы также включают соответствующие количества агентов, регулирующих объем и осмоляльность. Объемобразующие агенты включают, например, без ограничения, маннит, глицин, сахарозу, полимеры, такие как декстран, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу, лактозу, сорбит, трегалозу или ксилит. В одном варианте осуществления объемобразующим агентом является маннит. Объемобразующий агент вводят в концентрации около 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 или 1000 мМ.

Фармацевтические ПАВ.

Белки имеют высокую склонность к взаимодействию с поверхностями, что делает их восприимчивыми к адсорбции и денатурации на границах раздела воздух-жидкость, флакон-жидкость и жидкость-жидкость (кремнийорганическая смазка). Было обнаружено, что этот путь разложения обратно пропорционально зависит от концентрации белка и приводит либо к образованию растворимых и нерастворимых белковых агрегатов, либо к потере белка из раствора посредством адсорбции на поверхности. Помимо адсорбции на поверхности контейнера, деградация, вызванная поверхностью, усугубляется физическим взбалтыванием, как при транспортировке и обращении с продуктом.

Поверхностно-активные вещества обычно используются в белковых составах для предотвращения разложения, вызванного поверхностью. Поверхностно-активные вещества представляют собой амфипатические молекулы, способные вытеснить белки за межфазные позиции. Гидрофобные части молекул поверхностно-активного вещества занимают межфазные позиции (например, воздух/жидкость), в то время как гидрофильные части молекул остаются ориентированными в сторону объема растворителя. При достаточных концентрациях (обычно около критической мицеллярной концентрации детергента) поверхностный слой молекул поверхностно-активного вещества служит для предотвращения адсорбции молекул белка на границе раздела. Таким образом, деградация, вызванная поверхностью, сводится к минимуму. Рассматриваемые в данном документе поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, сложные эфиры жирных кислот и полиэтоксилатов сорбитана, например, полисорбат 20 и полисорбат 80. Они различаются только длиной алифатической цепи, которая придает гидрофобный характер молекулам C-12 и C-18, соответственно. Соответственно, полисорбат 80 более поверхностно-активен и имеет более низкую критическую мицеллярную концентрацию, чем полисорбат 20.

Детергенты также могут влиять на термодинамическую конформационную стабильность белков. Здесь снова эффекты данного детергентного наполнителя будут специфичными для белка. Например, было показано, что полисорбаты снижают стабильность одних белков и повышают стабильность других. Дестабилизация белков детергентом может быть объяснена с точки зрения гидрофобных хвостов молекул детергента, которые могут участвовать в специфическом связывании с частично или полностью развернутыми состояниями белка. Эти типы взаимодействий могут вызвать сдвиг конформационного равновесия в сторону более расширенных состояний белка (например, увеличение экспозиции гидрофобных частей молекулы белка в дополнение к связывающему полисорбату). В качестве альтернативы, если в нативном состоянии белка обнаруживаются некоторые гидрофобные поверхности, связывание детергента с нативным состоянием может стабилизировать эту конформацию.

Другой аспект полисорбатов заключается в том, что они по своей природе подвержены окислительному повреждению. Часто в качестве сырья они содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Возможность окислительного повреждения, возникающего при добавлении стабилизатора, подчеркивает, что в составах следует использовать самые низкие эффективные концентрации эксципиентов. Для поверхностно-активных веществ эффективная концентрация данного белка будет зависеть от механизма стабилизации.

Поверхностно-активные вещества также добавляются в соответствующих количествах для предотвращения явления агрегации на поверхности во время замораживания и сушки (Chang, B, *J. Pharm. Sci.* 85:1325, (1996)). Таким образом, типичные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, анионные, катионные, неионогенные, цвиттерийные и амфотерные поверхностно-активные вещества, включая поверхностно-активные вещества, полученные из встречающихся в природе аминокислот. Анионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия, хенодзоксихолевою кислоту, натриевую соль N-лауроилсаркозина, додецилсульфат лития, натриевую соль 1-октансульфоновой кислоты, гидрат холата натрия, дезоксихолат натрия и натриевую соль гликодеоксихолевою кислоты. Катионные поверхност-

но-активные вещества включают, без ограничения, хлорид бензалкония или хлорид бензетония, моногидрат хлорида цетилпиридиния и бромид гексадецилтриметиламмония. Цвиттерионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 и SB3-12. Неионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, дигитонин, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 и TWEEN-80. Поверхностно-активные вещества также включают, без ограничения, лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрированное касторовое масло 10, 40, 50 и 60, моностеарат глицерина, полисорбат 40, 60, 65 и 80, соевый лецитин и другие фосфолипиды, такие как диолеилфосфатидилхолин (DOPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и (диолеилфосфатидилглицерин) DOPG; сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлоза и карбоксиметилцеллюлоза. Поэтому дополнительно предлагаются композиции, содержащие эти поверхностно-активные вещества либо по отдельности, либо в виде смеси в различных соотношениях. В одном варианте настоящего изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой TWEEN-80. В данных составах поверхностно-активное вещество вводят в концентрации от около 0,01 до около 0,5 г/л. В предложенных составах концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 г/л.

Фармацевтические соли.

Соли часто добавляют для увеличения ионной силы препарата, что может иметь важное значение для растворимости белка, физической стабильности и изотоничности. Соли могут влиять на физическую стабильность белков по-разному. Ионы могут стабилизировать естественное состояние белков, связываясь с заряженными остатками на поверхности белка. Альтернативно, соли могут стабилизировать денатурированное состояние путем связывания с пептидными группами вдоль основной цепи белка (-CONH-). Соли также могут стабилизировать нативную конформацию белка, экранируя отталкивающие электростатические взаимодействия между остатками в молекуле белка. Соли в белковых составах также могут защищать привлекательные электростатические взаимодействия между белковыми молекулами, которые могут привести к агрегации белков и нерастворимости. В предложенных составах концентрация соли находится между 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 и 500 мМ.

Другие распространенные вспомогательные компоненты: фармацевтические аминокислоты.

Аминокислоты нашли универсальное применение в белковых составах в качестве буферов, объемобразующих агентов, стабилизаторов и антиоксидантов. Таким образом, в одном аспекте гистидин и глутаминовая кислота используются для буферизации белковых композиций в диапазоне pH 5,5-6,5 и 4,0-5,5 соответственно. Имидазольная группа гистидина имеет $pK_a=6,0$, а карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты имеет pK_a 4,3, что делает эти аминокислоты подходящими для буферизации в их соответствующих диапазонах pH. В таких случаях особенно полезна глутаминовая кислота. Гистидин обычно содержится в продаваемых на рынке белковых препаратах, и эта аминокислота представляет собой альтернативу цитрату, буферу, который, как известно, вызывает жжение при инъекции. Интересно, что гистидин также обладает стабилизирующим эффектом в отношении агрегации при использовании в высоких концентрациях как в жидких, так и в лиофилизированных составах (Chen B, et al., *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)). Другие наблюдали, что гистидин снижает вязкость состава с высокой концентрацией белка. Однако в том же исследовании авторы наблюдали повышенную агрегацию и обесцвечивание составов, содержащих гистидин, во время исследований антител в условиях замораживания-оттаивания в контейнерах из нержавеющей стали. Еще одно предостережение при применении гистидина заключается в том, что он подвергается фотоокислению в присутствии ионов металлов (Tomita M, et al., *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). Использование метионина в качестве антиоксиданта в составах представляется многообещающим; было замечено, что он эффективен против ряда окислительных стрессов (Lam XM, et al., *J Pharm ScL*, 86(11): 1250-5 (1997)).

В различных аспектах предложены составы, которые содержат одну или более аминокислот, глицин, пролин, серин, аргинин и аланин, которые, как было показано, стабилизируют белки посредством механизма предпочтительного исключения. Глицин также является обычно используемым объемобразующим агентом в лиофилизированных составах. Было показано, что аргинин является эффективным средством подавления агрегации и используется как в жидких, так и в лиофилизированных составах.

В предложенных составах концентрация аминокислот составляет 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 и 500 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота представляет собой глицин.

Другие распространенные вспомогательные компоненты: фармацевтические антиоксиданты.

Окисление белковых остатков происходит из различных источников. Помимо добавления специфических антиоксидантов, предотвращение окислительного повреждения белков включает тщательный контроль ряда факторов в процессе производства и хранения продукта, таких как атмосферный кислород, температура, воздействие света и химическое загрязнение. Следовательно, изобретение предполагает использование фармацевтических антиоксидантов, без ограничения, восстанавливающие агенты, поглотители кислорода/свободных радикалов или хелатирующие агенты. Антиоксиданты в терапевтических белковых композициях в одном аспекте являются водорастворимыми и остаются активными в течение всего срока годности продукта. Восстановители и поглотители кислорода/свободных ради-

калов работают, удаляя активные формы кислорода в растворе. Хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, эффективны, связывая следы металлических примесей, которые способствуют образованию свободных радикалов. Например, ЭДТА использовали в жидком составе кислого фактора роста фибробластов для ингибирования окисления остатков цистеина, катализируемого ионами металлов.

Помимо эффективности различных эксципиентов для предотвращения окисления белка, вызывает способность самих антиоксидантов вызывать другие ковалентные или физические изменения белка. Например, восстановители могут вызвать нарушение внутримолекулярных дисульфидных связей, что может привести к перетасовке дисульфидов. Было показано, что в присутствии ионов переходных металлов аскорбиновая кислота и ЭДТА способствуют окислению метионина в ряде белков и пептидов (Akers MJ, and Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. In: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. *Pharmaceutical Science*. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J.R./*Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, et al., *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)). Сообщалось, что тиосульфат натрия снижает уровни окисления метионина, вызванного светом и температурой, в rhuMab HER2; однако в этом исследовании также сообщалось об образовании аддукта тиосульфат-белок (Lam XM, Yang JY, et al., *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997)). Выбор подходящего антиоксиданта производится в зависимости от специфических нагрузок и чувствительности белка. Антиоксиданты, рассматриваемые в определенных аспектах, включают, без ограничения, восстанавливающие агенты и поглотители кислорода/свободных радикалов, ЭДТА и тиосульфат натрия.

Другие распространенные вспомогательные компоненты: фармацевтические ионы металлов.

Как правило, ионы переходных металлов нежелательны в составах белков, поскольку они могут катализировать физические и химические реакции разложения белков. Однако конкретные ионы металлов включаются в составы, когда они являются кофакторами белков, и в составы суспензий белков, где они образуют координационные комплексы (например, цинковая суспензия инсулина). Недавно было предложено использование ионов магния (10-120 мМ) для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту (WO 2004039337).

Двумя примерами, в которых ионы металлов придают стабильность или повышенную активность белков, являются дезоксирибонуклеаза человека (рчДНаза, Pulmozyme®) и фактор VIII. В случае рчДНазы ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) повышают стабильность фермента через специфический сайт связывания (Chen B. et al./*Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)). Фактически, удаление ионов кальция из раствора с помощью ЭДТА вызывает усиление дезамидирования и агрегации. Однако этот эффект наблюдался только при ионах Ca^{+2} ; было показано, что другие двухвалентные катионы Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} вызывают дестабилизацию рчДНазы. Подобные эффекты наблюдались с Фактором VIII. Ионы Ca^{+2} и Sr^{+2} стабилизировали белок, в то время как другие, такие как Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , дестабилизировали фермент (Fatouros, A., et al., *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997)). В отдельном исследовании фактора VIII наблюдалось значительное увеличение скорости агрегации в присутствии ионов Al^{+3} (Derrick TS, et al./*Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004)). Авторы отмечают, что другие эксципиенты, такие как буферные соли, часто загрязнены ионами Al^{+3} , и иллюстрируют необходимость использования вспомогательных веществ соответствующего качества в готовых продуктах.

Другие распространенные вспомогательные компоненты: фармацевтические консерванты.

Консерванты необходимы при разработке многодозовых парентеральных препаратов, которые включают более одной экстракции из одного контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микробов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности или срока использования лекарственного препарата. Обычно используемые консерванты включают, без ограничения, бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты используются давно, разработка белковых составов, включающих консерванты, может оказаться сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее действие (агрегацию) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в многодозовых белковых составах (Roy S, et al., *J Pharm ScL*, 94(2): 382-96 (2005)).

На сегодняшний день большинство белковых препаратов разработано только для однократного использования. Однако, когда возможны составы с несколькими дозами, у них есть дополнительное преимущество, заключающееся в удобстве для пациента и повышении конкурентоспособности. Хорошим примером является человеческий гормон роста (hGH), в котором разработка консервированных составов привела к коммерциализации более удобных, многоцелевых инъекционных ручек. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства-ручки, содержащие консервированные составы hGH. Norditropin® (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (жидкость, Genentech) & Genotropin (лиофилизированный двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatrop® (Eli Lilly) содержит м-крезол.

При разработке составов консервированных лекарственных форм необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном препарате должна быть оптимизирована. Это требует тестирования данного консерванта в лекарственной форме с диапазонами концентраций, которые обеспечивают антимикробную эффективность без нарушения стабильности белка. Напри-

мер, три консерванта были успешно проверены при разработке жидкого состава для рецептора интерлейкина-1 (тип I) с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Консерванты были упорядочены в зависимости от их влияния на стабильность при концентрациях, обычно используемых в рыночных продуктах (Remmele RL Jr., et al., *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998)).

Разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем лиофилизированные составы. Лيوфилизированные продукты могут быть лиофилизированы без консерванта и восстановлены консервантом, содержащим разбавитель, во время использования. Это сокращает время, в течение которого консервант находится в контакте с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски стабильности. В случае жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта (от 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в окончательном составе, содержащем активное лекарственное средство и все компоненты-эксципиенты.

Некоторые консерванты могут вызывать реакции в месте инъекции, что является еще одним фактором, который необходимо учитывать при выборе консерванта. В клинических испытаниях, которые были сосредоточены на оценке консервантов и буферов в Нордитропине, восприятие боли было меньше в составах, содержащих фенол и бензиловый спирт, по сравнению с составом, содержащим м-крезол (Kappelgaard A.M., *Norm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)). Интересно, что среди широко используемых консервантов бензиловый спирт обладает анестезирующими свойствами (Minogue SC, and Sun DA., *AnesthAnalg.*, 100(3): 683-6 (2005)). В различных аспектах использование консервантов дает преимущество, которое перевешивает любые побочные эффекты.

Способы приготовления фармацевтических составов.

В данном изобретении также предложены способы приготовления фармацевтических составов.

Данные способы дополнительно включают одну или более из следующих стадий: добавление стабилизирующего агента, как описано в данном документе, к указанной смеси перед лиофилизацией, добавление по меньшей мере одного агента, выбранного из объемообразующего агента, агента, регулирующего осмоляльность, и поверхностно-активного вещества, каждый из которых, как описано в данном документе, к указанной смеси перед лиофилизацией.

Стандартная практика восстановления лиофилизированного материала заключается в добавлении объема чистой воды или стерильной воды для инъекций (WFI) (обычно эквивалентного объему, удаляемому во время лиофилизации), хотя разбавленные растворы антибактериальных агентов иногда используются в производстве фармацевтических препаратов для парентерального введения (Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18:1311-1354 (1992)). Соответственно, предложены способы приготовления восстановленных композиций рФВ, включающие стадию добавления разбавителя к лиофилизированной композиции рФВ по изобретению.

Лيوфилизированный материал может быть восстановлен в виде водного раствора. Разнообразные водные носители, например, стерильная вода для инъекций, вода с консервантами для многократного использования или вода с соответствующими количествами поверхностно-активных веществ (например, водная суспензия, которая содержит активное соединение в смеси с эксципиентами, подходящими для производства водных суспензий). В различных аспектах такие эксципиенты представляют собой суспендирующие агенты, например, но без ограничения, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и камедь акации; диспергирующие или смачивающие агенты представляют собой встречающийся в природе фосфатид, например, без ограничения, лецитин, или продукты конденсации оксида алкилена с жирными кислотами, например, без ограничения, полиоксиэтилен стеарат или продукты конденсации оксида этилена с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, без ограничения, гептадекаэтиленоксиданол или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, такие как моноолеат полиоксиэтиленсорбита, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например, и без ограничения, моноолеат полиэтиленсорбитана. В различных аспектах водные суспензии также содержат один или более консервантов, например, без ограничения, этил или n-пропил, p-гидроксibenzoат.

Иллюстративный состав рФВ для введения.

В некоторых вариантах осуществления данные способы обеспечивают улучшенный состав, который позволяет получить конечный препарат с высокой эффективностью (высокая концентрация рФВ и повышенная долгосрочная стабильность), чтобы уменьшить объем для лечения (от 100 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл). В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 100 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 500 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 1000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 2000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 3000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентра-

ция рФВ в составе для введения составляет от около 4000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 5000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 6000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 7000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 8000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация рФВ в составе для введения составляет от около 9000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит одно или более цвиттерионных соединений, включая, например, такие аминокислоты, как гистидин, глицин, аргинин. В некоторых вариантах осуществления состав для введения включает компонент с амфипатическими характеристиками, имеющий по меньшей мере одну гидрофобную и одну гидрофильную группу, включая, например, полисорбат 80, октилпиранозид, дипептиды и/или амфипатические пептиды. В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит невосстанавливающий сахар или сахарный спирт или дисахариды, включая, например, сорбит, маннит, сахарозу или трегалозу. В некоторых вариантах осуществления состав для введения включает нетоксичную водорастворимую соль, включая, например, хлорид натрия, что приводит к физиологической осмоляльности. В некоторых вариантах осуществления состав для введения имеет рН в диапазоне от 6,0 до 8,0. В некоторых вариантах осуществления состав для введения имеет рН около 6,0, около 6,5, около 7, около 7,5 или около 8,0. В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит один или более двухвалентных катионов, которые стабилизируют рФВ, включая, например, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} и/или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит от около 1 мМ до около 50 мМ глицина, от около 1 мМ до около 50 мМ гистидина, от около нуля до около 300 мМ хлорида натрия (например, менее 300 мМ натрия), от около 0,01% до около 0,05% полисорбата 20 (или полисорбата 80) и от около 0,5% до около 20% (мас./мас.) сахарозы с рН около 7,0 и физиологической осмоляльностью в момент введения.

В некоторых вариантах осуществления состав для введения может быть высушен замораживанием. В некоторых вариантах осуществления состав для введения является стабильным и может храниться в жидком состоянии при температуре от около 2°C до около 8°C, а также от около 18°C до около 25°C. В некоторых вариантах осуществления состав для введения стабилен и может храниться в жидком состоянии при температуре от около 2°C до около 8°C. В некоторых вариантах осуществления состав для введения стабилен и может храниться в жидком состоянии при температуре от около 18°C до около 25°C.

Введение рФВ для способов профилактического лечения у пациентов с тяжелой формой БВ.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлено профилактическое лечение эпизодов спонтанного кровотечения у субъекта с тяжелой формой болезни фон Виллебранда (БВ). В некоторых вариантах осуществления профилактическое лечение включает введение субъекту рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) для снижения частоты и/или продолжительности эпизодов спонтанного кровотечения.

В некоторых вариантах осуществления эпизоды спонтанного кровотечения включают любой эпизод, не связанный с травмой. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения проявляется в снижении количества эпизодов спонтанного кровотечения. В некоторых вариантах осуществления снижение количества эпизодов спонтанного кровотечения проявляется в снижении годовой частоты кровотечений (ГЧК). В некоторых вариантах осуществления ГЧК до лечения определяют по следующей формуле: количество кровотечений/дни не на схеме лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения ГЧК до лечения определяют по следующей формуле: количество кровотечений/12 месяцев до начала профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления ГЧК для профилактики (ГЧК после профилактического лечения) определяют по следующей формуле: количество кровотечений/дней на схеме лечения.

В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 25\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактики рФВ по сравнению с предварительной ГЧК свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 30\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 35\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 40\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 45\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В неко-

торых вариантах осуществления снижение на $\geq 50\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 55\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 60\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 65\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 70\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 75\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 80\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 85\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение на $\geq 90\%$ годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ по сравнению с ГЧК до лечения свидетельствует об эффективности профилактического лечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения может быть измерена путем получения образцов и оценки активности ФВ:КР и/или FVIII до и после профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают до профилактического лечения рФВ и после профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 15 минут, 30 минут, 60 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 28 часов, 32 часа, 48 часов, 72 часа или 96 часов после профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают через 25-31 день после профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы для определения активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ получают после или во время эпизода кровотечения, и в таких вариантах осуществления образец берут до введения рФВ, через 2 часа после введения и затем каждые 12-24 часа до разрешения кровотечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения может быть определена после или во время эпизода кровотечения, и в таких вариантах осуществления образцы для оценки активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают после эпизода кровотечения, и, кроме того, образцы получают до введения рФВ, через 2 часа после введения и затем каждые 12-24 часа до разрешения явления кровотечения. В некоторых вариантах осуществления активность FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и коллагенсвязывающей способности ФВ в зависимости от времени определяют на основе образцов для мониторинга эффективности лечения в отношении профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления FVIII:C также измеряют с помощью 1-стадийного анализа свертывания крови в зависимости от времени для мониторинга эффективности лечения в отношении профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления уровни активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ улучшаются после профилактического лечения рФВ по сравнению с уровнями до профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления уровни активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ улучшаются после профилактического лечения рФВ по сравнению с уровнями до профилактического лечения рФВ, и это улучшение свидетельствует об эффективности лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в повышении уровней активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ после профилактического лечения рФВ по сравнению с уровнями до профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления улучшение уровней активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ включает изменение уровней активности таким образом, что уровни активности приближаются к нормальным уровням, например, уровням у субъекта, не имеющего БВ.

В некоторых аспектах эффективность профилактического лечения при введении рФВ определяют после или во время эпизода кровотечения. В некоторых вариантах осуществления образцы для оценки

активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают после эпизода кровотечения. В некоторых вариантах осуществления образцы для исследования активности FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающей способности ФВ получают во время эпизода кровотечения. В некоторых случаях образцы получают от пациента во время эпизода кровотечения, чтобы по ним можно было определить активность FVIII, FVIII:C, ФВ:КР, ФВ:Аг и/или коллагенсвязывающую способность ФВ. В других случаях образцы получают от пациента после эпизода кровотечения. В некоторых вариантах осуществления образцы получают до введения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы получают после введения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы получают через 2 часа после введения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы получают каждые 12-24 часа до разрешения эпизода кровотечения. В определенных вариантах осуществления образцы получают до введения рФВ и через 2 часа после введения рФВ. В некоторых вариантах осуществления образцы получают до введения рФВ и каждые 12-24 часа до разрешения эпизода кровотечения. В других вариантах осуществления образцы получают до введения рФВ, через 2 часа после введения рФВ и каждые 12-24 часа до разрешения эпизода кровотечения. Таким образом, образцы могут быть получены до введения рФВ и до эпизода кровотечения. В некоторых вариантах осуществления образцы получают после введения рФВ и до эпизода кровотечения. В некоторых вариантах осуществления образцы получают после введения рФВ и во время эпизода кровотечения. В некоторых вариантах осуществления образцы получают после введения рФВ и после разрешения эпизода кровотечения.

В некоторых аспектах рФВ вводят субъекту в диапазоне 40-80 МЕ/кг, например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 40-100, 40-80, 50-80, 60-80, 70-80, 40-50, 40-60, 40-70, 40-50, 50-60, 60-70 или 70-80 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят не реже одного раза в неделю для предотвращения эпизода спонтанного кровотечения. В некоторых случаях субъекту однократно вводят рФВ. В некоторых случаях субъекту вводят однократную инфузию рФВ.

В некоторых аспектах рФВ вводят субъекту в диапазоне 40-80 МЕ/кг, например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 40-100, 40-80, 50-80, 60-80, 70-80, 40-50, 40-60, 40-70, 40-50, 50-60, 60-70 или 70-80 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет от 45 МЕ/кг до 55 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет около 40 МЕ/кг, около 50 МЕ/кг или около 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят по меньшей мере два раза в неделю для предотвращения эпизода спонтанного кровотечения. В других вариантах осуществления рФВ вводят два или более раз, например, 2, 3, 4, 5 или более раз в неделю, чтобы предотвратить эпизод спонтанного кровотечения. В некоторых случаях субъекту вводят рФВ два раза. В некоторых случаях субъект получает две инфузии рФВ. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю в виде инфузии в дозе от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят дважды в неделю в дозе от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг путем внутривенной инфузии. Каждая инфузия может включать около 40-80 МЕ/кг рФВ, например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 40-80, 50-80, 60-80, 40-50, 40-60, 40-70, 40-50, 50-60, 60-70, или 70-80 МЕ/кг рФВ. В некоторых вариантах осуществления каждая инфузия составляет от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления каждая инфузия составляет от 45 МЕ/кг до 55 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления каждая инфузия составляет около 40 МЕ/кг, около 50 МЕ/кг или около 60 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления инфузии могут быть по существу равны по количеству. Например, первая инфузия и вторая инфузия могут быть по существу равны по количеству. В некоторых вариантах осуществления общая доза рФВ, вводимая субъекту, составляет около 40-160 МЕ/кг, например, 40-150, 40-125, 40-100, 40-90, 40-75, 50-150, 50-100, 75-150, 100-125, или 100-160 МЕ/кг.

В некоторых аспектах рФВ вводят субъекту в диапазоне 40-80 МЕ/кг, например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 40-100, 40-80, 50-80, 60-80, 70-80, 40-50, 40-60, 40-70, 40-50, 50-60, 60-70 или 70-80 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят по меньшей мере два раза в неделю для предотвращения эпизода спонтанного кровотечения. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят по меньшей мере три раза в неделю для предотвращения эпизода спонтанного кровотечения. В других вариантах осуществления рФВ вводят три или более раз, например, 3, 4, 5 или более раз в неделю для предотвращения эпизода спонтанного кровотечения. В некоторых случаях субъекту вводят рФВ три раза. В некоторых случаях субъекту вводят три инфузии рФВ. Каждая инфузия может включать около 40-80 МЕ/кг рФВ, например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 40-80, 50-80, 60-80, 70-80, 40-50, 40-60, 40-70, 40-50, 50-60, 60-70, или 70-80 МЕ/кг рФВ. В некоторых вариантах осуществления инфузии могут быть по существу равны по количеству. Например, первая инфузия, вторая инфузия и третья инфузия могут быть по существу равны по количеству. В некоторых вариантах осуществления общая доза рФВ, вводимая субъекту, составляет около 80-240 МЕ/кг, например, 120-240, 140-240, 140-200, 160-240, 180-240, 200-240, 80-120, 80-160, 80-200, 120-220, или 220-240 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления общая доза рФВ, вводимая субъекту, составляет менее около 160 МЕ/кг в неделю. В некоторых вариантах осуществления общая доза рФВ, вводимая субъекту, составляет менее около 240 МЕ/кг в неделю.

В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят по меньшей мере один раз в неделю, по меньшей мере дважды (два раза) в неделю, по меньшей мере трижды (три раза) в неделю, каждый день, каж-

дый второй день, каждые 2-3 дня, каждые 2-4 дня, каждые 2-5 дней и тому подобное. В некоторых случаях рФВ вводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней в течение 7-дневного периода. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят в течение нескольких дней подряд. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят в течение нескольких дней подряд.

В некоторых вариантах осуществления рФА вводят по меньшей мере каждые 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 84 часа или 96 часов. В некоторых случаях рФВ вводят по меньшей мере каждые 60 часов, 72 часа или 84 часа. В некоторых случаях рФВ вводят по меньшей мере каждые 72 часа.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фактор VIII (rFVIII) также вводят субъекту с тяжелой формой БВ для предотвращения или уменьшения частоты и/или продолжительности эпизода спонтанного кровотечения. В некоторых случаях назначаемое лечение включает рФВ и rFVIII. В других случаях назначаемое лечение не включает rFVIII. В некоторых вариантах осуществления rFVIII вводят субъекту в дозе около 10-70 МЕ/кг, например, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, или 60-70 МЕ/кг. В некоторых случаях rFVIII вводят в начальной (первой) дозе или начальной (первой) инфузии. В некоторых случаях rFVIII не вводят в начальной (первой) дозе или начальной (первой) инфузии. В некоторых случаях rFVIII вводят в виде части второй дозы или второй инфузии. В некоторых случаях rFVIII не вводят в виде части второй дозы или второй инфузии. В некоторых случаях rFVIII вводят в виде части третьей дозы или третьей инфузии. В некоторых случаях rFVIII не вводят в виде части третьей дозы или третьей инфузии.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят однократную инфузию рФВ и rFVIII. В некоторых вариантах осуществления второе введение рФВ не выполняют с введением FVIII. В некоторых вариантах осуществления третье введение рФВ не выполняют с введением FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят однократную инфузию рФВ и rFVIII. В некоторых вариантах осуществления второе введение рФВ выполняют с введением FVIII. В некоторых вариантах осуществления третье введение рФВ не выполняют с введением FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят однократную инфузию рФВ и rFVIII. В некоторых вариантах осуществления второе введение рФВ выполняют с введением FVIII. В некоторых вариантах осуществления третье введение рФВ выполняют с введением FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят однократную инфузию рФВ, а не rFVIII. В некоторых вариантах осуществления второе введение рФВ выполняют с введением FVIII. В некоторых вариантах осуществления третье введение рФВ выполняют с введением FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят однократную инфузию рФВ, а не rFVIII. В некоторых вариантах осуществления второе введение рФВ не выполняют с введением FVIII. В некоторых вариантах осуществления третье введение рФВ выполняют с введением FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят однократную инфузию рФВ, а не rFVIII. В некоторых вариантах осуществления второе введение рФВ выполняют с введением FVIII. В некоторых вариантах осуществления третье введение рФВ не выполняют с введением FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят первую инфузию и вторую инфузию рФВ. В некоторых вариантах осуществления первую и/или вторую инфузию рФВ вводят вместе с FVIII.

В некоторых вариантах осуществления субъекту с БВ, который подвержен риску возникновения эпизода спонтанного кровотечения, вводят первую инфузию, вторую инфузию и третью инфузию рФВ. В некоторых вариантах осуществления первую, вторую и/или третью инфузии рФВ вводят вместе с FVIII.

В некоторых вариантах осуществления способа, когда рФВ и FVIII вводят вместе, соотношение рФВ и FVIII составляет около 1,5:0,8. В некоторых вариантах осуществления способа, когда рФВ и FVIII вводят вместе, соотношение рФВ и FVIII составляет около 1,3:1. В некоторых вариантах осуществления способа, когда рФВ и FVIII вводят вместе, соотношение рФВ и FVIII составляет около 1,1:0,8. В некоторых вариантах осуществления способа, когда рФВ и FVIII вводят вместе, соотношение рФВ и FVIII составляет около 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления способа, когда рФВ и FVIII вводят вместе, соотношение рФВ и FVIII составляет около 1,1:1,2.

В некоторых вариантах осуществления для профилактики спонтанного кровотечения вводят около 40 МЕ/кг рФВ. В некоторых вариантах осуществления для профилактики спонтанного кровотечения вводят около 45 МЕ/кг рФВ. В некоторых вариантах осуществления для профилактики спонтанного кровотечения вводят около 50 МЕ/кг рФВ. В некоторых вариантах осуществления для профилактики спонтанного кровотечения вводят около 55 МЕ/кг рФВ. В некоторых вариантах осуществления для профи-

отдельных доз или по меньшей мере 2 инфузий. В некоторых вариантах осуществления субъект проходит по меньшей мере две дозы в неделю. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде 2 инфузий. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде 2 внутривенных инфузий. В некоторых случаях субъекту вводят дозу рФВ два раза в неделю или, другими словами, субъекту вводят рФВ два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде 2 внутривенных инфузий. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту дважды в неделю. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту каждые 3 или 4 дня. В некоторых вариантах осуществления вводят первую инфузию рФВ, а вторую инфузию рФВ вводят через 4 дня в течение 7 дней. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят однократно в 1-й день и на 5-й день в течение 7-дневного периода (неделя) для профилактического лечения спонтанного кровотечения. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят недельную дозу, которая делится на две инфузии, так что субъект получает первую инфузию в 1-й день, а вторую инфузию на 5-й день недельного периода. В некоторых вариантах осуществления для профилактического лечения спонтанного кровотечения на 2-й и 6-й день недельного периода однократно вводят рФВ. В некоторых вариантах осуществления осуществления субъекту вводят недельную дозу, которая делится на две инфузии, так что субъект получает первую инфузию в 2-й день, а вторую инфузию на 6-й день недельного периода. В некоторых вариантах осуществления для профилактического лечения спонтанного кровотечения на 3-й и 7-й день недельного периода однократно вводят рФВ. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят недельную дозу, которая делится на две инфузии, так что субъект получает первую инфузию в 3-й день, а вторую инфузию на 7-й день недельного периода. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ составляет до 80 МЕ/кг рФВ на каждую инфузию. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ делится на 2 внутривенные инфузии до 80 МЕ/кг рФВ на каждую инфузию.

В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде по меньшей мере 3 отдельных доз или по меньшей мере 3 инфузий. В некоторых вариантах осуществления субъект получает по меньшей мере 3 дозы в неделю. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде 3 внутривенных инфузий. В некоторых случаях субъекту вводят дозу рФВ три раза в неделю или, другими словами, субъекту вводят рФВ трижды в неделю. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде 3 внутривенных инфузий, причем каждую инфузию проводят в разные дни. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят субъекту каждые 2 или 3 дня. В некоторых вариантах осуществления вводят первую инфузию рФВ, вторую инфузию рФВ вводят через 2 дня, а третью инфузию рФВ вводят через 3 дня в течение 7 дней. В некоторых вариантах осуществления для профилактического лечения спонтанного кровотечения в 1-й день, 3-й день и 6-й день 7-дневного периода однократно вводят рФВ. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят недельную дозу, которая делится на 3 инфузии, так что субъект получает первую инфузию в 1-й день, вторую инфузию на 3-й день, третью инфузию на 6-й день недельного периода. В некоторых вариантах осуществления осуществления для профилактического лечения спонтанного кровотечения в 1-й день, 3-й день и 6-й день недельного периода рФВ вводят однократно. В некоторых вариантах осуществления осуществления субъекту вводят недельную дозу, которая делится на 3 инфузии таким образом, что субъект получает первую инфузию на 2-й день, вторую инфузию на 4-й день, третью инфузию на 7-й день недельного периода. В некоторых вариантах осуществления осуществления для профилактического лечения спонтанного кровотечения в 2-й день, 4-й день и 7-й день недельного периода рФВ вводят однократно. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ составляет до 80 МЕ/кг рФВ на каждую инфузию. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ делится на 3 внутривенные инфузии до 80 МЕ/кг рФВ на каждую инфузию.

В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде одной дозы или одной инфузии. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде одной инфузии. В некоторых вариантах осуществления недельную дозу рФВ вводят в виде однократной внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу рФВ один раз в неделю, если субъект ранее получал дозу пФВ один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления недельная доза рФВ составляет до 80 МЕ/кг рФВ для такой инфузии.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдают по меньшей мере 5% снижение (например, 5%, 7%, 10%, 12%, 14%, 15%, 17%, 20%, 22%, 24%, 25%, 27%, 30%, 32%, 34%, 35%, 37%, 40%, 42%, 44%, 45%, 47%, 50% или большее снижение) годовой частоты кровотечений (ГЧК) в отношении явлений спонтанного кровотечения после получения профилактического лечения, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдают по меньшей мере 25%-ное снижение (например, 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более снижение) ГЧК в отношении явлений спонтанного кровотечения после получения профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления снижение количества эпизодов спонтанного кровотечения проявляется в снижении годовой частоты кровотечений (ГЧК). В некоторых вариантах осуществления осуществления ГЧК до лечения определяют по следующей формуле: количество кровотечений/дни не на схеме лечения. В некоторых вариантах осуществления осуществления изобретения ГЧК до лечения определяют по следующей формуле: количество кровотечений/12 месяцев до начала профилактического лечения рФВ. В

некоторых вариантах осуществления ГЧК для профилактики (ГЧК после профилактического лечения) определяют по следующей формуле: количество кровотечений/дней на схеме лечения.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта не возникают явления спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления у субъекта возникает 1-2 явления спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления у субъекта возникает 1-3 явления спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления у субъекта возникает 3-5 явлений спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления у субъекта возникает 1-5 явлений спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ. В некоторых вариантах осуществления у субъекта возникает более 5 явлений спонтанного кровотечения во время профилактического лечения рФВ.

В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 0 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 1 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 2 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 3 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 4 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 5 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения более чем до 5 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 1-5 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 3-5 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до 1-3 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до менее чем 5 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до менее чем 4 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до менее чем 3 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до менее чем 2 в год. В некоторых вариантах осуществления введение рФВ снижает количество явлений спонтанного кровотечения до менее чем 1 в год.

В некоторых вариантах осуществления профилактическое лечение уменьшает или снижает степень тяжести (например, легкие, умеренные и тяжелые эпизоды кровотечения), частоту возникновения, частоту или продолжительность эпизода спонтанного кровотечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, которому вводили рФВ, было меньше эпизодов спонтанного кровотечения, чем у контрольного субъекта, который не получал профилактического лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта, которому вводят рФВ, в течение курса лечения наблюдается меньше эпизодов спонтанного кровотечения, чем до начала лечения.

Как правило, на БВ типа 1 указывают <30 МЕ/дл ФВ:КР, <30 МЕ/дл ФВ:Аг, низкий или нормальный FVIII и $>0,5-0,7$ МЕ/дл соотношения ФВ:КР/ФВ:Аг. В некоторых вариантах осуществления субъект, у которого диагностирована БВ типа 1, имеет ФВ:КР <20 МЕ/дл. На БВ типа 2А указывают <30 МЕ/дл ФВ:КР, $<30-200$ МЕ/дл ФВ:Аг, низкий или нормальный FVIII, и $<0,5-0,7$ МЕ/дл соотношения ФВ:КР/ФВ:Аг. На БВ типа 2В указывают $<30-200$ МЕ/дл ФВ:КР, <30 МЕ/дл ФВ:Аг, низкий или нормальный FVIII, и, как правило, $<0,5-0,7$ МЕ/дл соотношения ФВ:КР/ФВ:Аг. На БВ типа 2М указывают <30 МЕ/дл ФВ:КР, $<30-200$ МЕ/дл ФВ:Аг, низкий или нормальный FVIII, и $<0,5-0,7$ МЕ/дл соотношения ФВ:КР/ФВ:Аг. На БВ типа 2N указывают $30-2000$ МЕ/дл ФВ:КР, $30-200$ МЕ/дл ФВ:Аг, очень низкий уровень FVIII и соотношение ФВ:КР/ФВ:Аг $>0,5-0,7$ МЕ/дл. На БВ типа 3 указывают <3 МЕ/дл ФВ:КР, <3 МЕ/дл ФВ:Аг, крайне низкий (<10 МЕ/дл) FVIII, а соотношение ФВ:КР/ФВ:Аг не применяется. В некоторых вариантах осуществления субъект с диагнозом БВ типа 3 имеет ФВ:Аг <3 МЕ/дл. Нормальным считается соотношение $50-200$ МЕ/дл ФВ:КР, $50-200$ МЕ/дл ФВ:Аг, нормальный FVIII и $>0,5-0,7$ МЕ/дл ФВ:КР/ФВ:Аг. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет БВ типа 3. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет тяжелую форму БВ типа 1. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет тяжелую форму БВ типа 2. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет тяжелую форму ВД типа 2А. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет тяжелую форму БВ типа 2В. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет тяжелую форму БВ типа 2М. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет тяжелую форму БВ типа 3.

В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в улучшении уровней активности FVIII, ФВ:КР и/или ФВ:Аг после профилактического лечения рФВ по сравнению с уровнями до профилактического лечения рФВ у пациентов с БВ типа 1. В некоторых вариантах осуществления улучшение уровней активности FVIII, ФВ:КР и/или ФВ:Аг включает изменение уровней активности таким образом, что уровни активности становятся ближе к нормальным уровням, например, уровням у субъекта, не имеющего БВ типа 1. В некоторых вариантах осуществления эффективность профилактического лечения проявляется в улучшении уровней активности FVIII, ФВ:КР и/или

В некоторых вариантах осуществления субъект в настоящее время получает лечение по необходимости в связи с явлением спонтанного кровотечения (например, эпизодом). В некоторых вариантах осуществления субъект в настоящее время получает терапию ФВ (например, терапию рФВ или пФВ) для лечения явления спонтанного кровотечения. В некоторых вариантах осуществления субъект в настоящее время не получает лечение по необходимости в связи с явлением спонтанного кровотечения (например, эпизодом). В некоторых вариантах осуществления субъект в настоящее время не получает терапию ФВ (например, терапию рФВ или пФВ) для лечения явления спонтанного кровотечения.

В некоторых вариантах осуществления субъект получал профилактическое лечение спонтанного кровотечения путем введения пФВ в течение предыдущих 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления субъект получал профилактическое лечение спонтанного кровотечения путем введения пФВ в течение предыдущих 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления субъект получал профилактическое лечение спонтанного кровотечения путем введения пФВ по меньшей мере в течение предыдущих 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления субъект не получал профилактическое лечение спонтанного кровотечения путем введения пФВ в течение предыдущих 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления субъект не получал профилактическое лечение спонтанного кровотечения путем введения пФВ по меньшей мере в течение предыдущих 12 месяцев.

Как правило, незначительное кровотечение характеризуется острым или подострым клинически явным кровотечением, которое не удовлетворяет критериям массивного кровотечения и привело к госпитализации с кровотечением, медикаментозному или хирургическому лечению кровотечения под контролем врача или изменению антитромботической терапии (включая исследуемые лекарственные препараты) при кровотечении (клиническое определение согласно Aristotle); все другие кровотечения (кроме большого и ICH) (клиническое определение согласно RE-LY); открытое кровотечение, не отвечающее критериям большого кровотечения, но требующее медицинского вмешательства, незапланированный контакт (посещение или телефон) с врачом, временное прекращение приема исследуемого лекарственного средства (например, отсроченное дозирование), боль или нарушение повседневной активности), клиническое определение согласно Rocket-AF); клинически значимое кровотечение определяли как гематому кожи $> 25 \text{ см}^2$, спонтанное носовое кровотечение продолжительностью > 5 минут, макроскопическая гематурия, спонтанное ректальное кровотечение, десневое кровотечение продолжительностью > 5 минут, любое кровотечение, ведущее к госпитализации, любое кровотечение, ведущее к переливанию крови < 2 ЕД, или любое другое кровотечение, которое исследователь считает значимым (клиническое определение согласно Petro); и/или CRNM (клинически значимое незначительное кровотечение), определяемое как острое или подострое, клинически явное, не большое, ведущее к госпитализации по поводу кровотечения, медицинское или хирургическое лечение кровотечения под руководством врача, или к изменению антитромботической терапии, а также незначительные кровотечения, определяемые как острые клинически явные явления, не отвечающие критериям ни большого кровотечения, ни кровотечения CRNM (клиническое определение согласно Aristotle-J). См., например, Wells G, Coyle D, Cameron C, et al. Safety, Effectiveness, and Cost-Effectiveness of New Oral Anticoagulants Compared with Warfarin in Preventing Stroke and Other Cardiovascular Events in Patients with Atrial Fibrillation [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2012 Apr 9. 3, CLINICAL REVIEW. Доступно в интернете по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169813/. Незначительное кровотечение может включать явления, которые были определены как явления, не соответствующие критериям большого или клинически значимого кровотечения; незначительное кровотечение из раны (кровотечение в месте инъекции, носовое кровотечение или гематома раны, не требующая оперативной декомпрессии); явное кровотечение, не соответствующее критериям большого кровотечения и связанное с ≥ 1 из следующего: носовое кровотечение продолжительностью более 5 минут или требующее вмешательства, экхимоз или гематома > 5 см в самом большом размере, гематурия, не связанная с травмой, связанной с мочевым катетером, кровоизлияние в желудочно-кишечный тракт, не связанное с интубацией или установкой назогастрального зонда, гематома раны или осложнения, субконъюнктивальное кровоизлияние, требующее прекращения приема лекарственных средств; незначительное кровотечение в ЖКТ или мочевыводящих путях и гематома в месте инъекции; и/или явное кровотечение, не отвечающее критериям серьезного кровотечения. См., например, Sobieraj DM, Coleman CI, Tongbram V, et al. Venous Thromboembolism Prophylaxis in Orthopedic Surgery [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2012 Mar. (Comparative Effectiveness Reviews, No. 49.) Appendix F, Additional Evidence Tables. Доступно в интернете по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92309/.

Обычно массивное кровотечение характеризуется по стандартам Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза (ISTH) и включает любое опасное для жизни и/или смертельное кровотечение; симптоматическое кровотечение в критическую область или орган, и массивное кровотечение было разделено на внутричерепное (внутри мозговое, субдуральное) и экстракраниальное (ЖКТ, отличная ЖКТ область) кровотечение (клиническое определение согласно RE-LY); симптом кровотечения в важную анатомическую область (клиническое определение согласно Rocket-AF); опасное для жизни за-

брюшинное, внутричерепное, внутриглазное или внутриспинальное кровотечение; или кровотечение, требующее хирургического вмешательства (клиническое определение согласно Artistle-J). Явления массивного кровотечения могут включать те, при которых наблюдается падение гемоглобина по меньшей мере на 20 г/л или переливание > 2 единиц цельной крови (эритроцитарная масса упоминается в определении опасного для жизни кровотечения; определение согласно RE-LY опасного для жизни кровотечения: ≥ 1 из следующих критериев: (1) смертельное симптоматическое внутричерепное кровотечение; (2) снижение уровня гемоглобина по меньшей мере на 5,0 г/л; (3) переливание по меньшей мере 4 ЕД крови или эритроцитарной массы; (4) связано с гипотензией, требующей использования внутривенных инотропных агентов или (5) необходимость хирургического вмешательства); падение гемоглобина на >2 г/дл или переливание >2 единиц цельной крови/эритроцитов (клиническое определение согласно ISTH или Rocket-AF); и/или кровотечение, требующее хирургического вмешательства или переливания ≥ 2 ЕД, или связано с эпизодами снижения гемоглобина на $\geq 2,0$ г/л. См., например, Wells G, Coyle D, Cameron C, et al. Safety, Effectiveness, and Cost-Effectiveness of New Oral Anticoagulants Compared with Warfarin in Preventing Stroke and Other Cardiovascular Events in Patients with Atrial Fibrillation [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2012 Apr 9. 3, CLINICAL REVIEW. Доступно в интернете по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169813/. Большое кровотечение может включать клинически явное кровотечение, связанное с падением гемоглобина > 20 г/л; клинически явное проявление, приводящее к переливанию >2 ЕД эритроцитарной массы или цельной крови; фатальное, забрюшинное, внутричерепное, внутриглазное или внутриспинальное кровотечение; кровотечение, требующее прекращения лечения или ведущее к повторной операции; фатальное, забрюшинное, внутричерепное или внутриспинальное кровотечение; кровотечение из любого другого критического органа; кровотечение, ведущее к повторной операции; явное кровотечение с индексом кровотечения ≥ 2 ; массивное кровотечение из раны (гематома раны, требующая оперативной декомпрессии) или большое кровотечение, не связанное с раной (желудочно-кишечное или внутримозговое кровоизлияние); клинически явное кровотечение, связанное либо со снижением гемоглобина на ≥ 2 г/дл, либо с необходимостью переливания ≥ 2 ЕД эритроцитов; внутричерепно или забрюшинно (что привело к окончательному прекращению антикоагулянтной терапии). См., например, Sobieraj DM, Coleman CI, Tongbram V, et al. Venous Thromboembolism Prophylaxis in Orthopedic Surgery [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2012 Mar. (Comparative Effectiveness Reviews, No. 49.) Appendix F, Additional Evidence Tables. Available from: the World Wide Web at www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92309/.

Композиции рФВ могут содержаться в фармацевтических составах, как описано в данном документе. Такие составы можно вводить перорально, местно, трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или путем внутричерепной инъекции. Используемый в данном документе термин "парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные инъекции или методы инфузии. В некоторых вариантах осуществления рФВ вводят внутривенно. Также рассматривается введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрааммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретный участок. Обычно композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

В одном аспекте составы по данному изобретению вводят путем начального болюсного введения с последующей непрерывной инфузией для поддержания терапевтических уровней лекарственного препарата в крови. В качестве другого примера соединение по изобретению вводят в виде однократной дозы. Специалисты в данной области техники легко оптимизируют эффективные дозировки и режимы введения, определяемые надлежащей медицинской практикой и клиническим состоянием отдельного пациента. Путь введения может быть, но не ограничивается этим, внутривенным, внутрибрюшинным, подкожным или внутримышечным. Частота дозирования зависит от фармакокинетических параметров агентов и способа введения. Оптимальный фармацевтический состав определяется специалистом в данной области техники в зависимости от пути введения и желаемой дозировки. Например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 стр. 1435-1712, раскрытие которого настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с составами, путями введения и дозировками для фармацевтических продуктов. Такие составы влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения вводимых агентов *in vivo*. В зависимости от пути введения подходящая доза рассчитывается в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размером органа. Подходящие дозы могут быть установлены с помощью общепринятых анализов для определения доз в крови в сочетании с соответствующими данными доза-реакция. Окончательную схему лечения определяет лечащий врач с учетом различных факторов, которые изменяют действие лекарственных средств, например, специфическую активность лекарственного средства, тяжесть повреждения и реакцию пациента, возраст, состояние, массу тела, пол и диету пациента, степень тяжести инфекции, время введения и другие клинические факторы. Например, типичная доза рекомбинантного ФВ по данному изобретению составляет приблизительно 50 Ед/кг, что равно 500 мкг/кг. По мере проведения исследований будет появляться до-

полнительная информация относительно соответствующих уровней дозировки и продолжительности лечения различных заболеваний и патологических состояний.

В практическом применении настоящего изобретения может использоваться, если не указано иное, традиционные методы и описания органической химии, технологии полимеров, молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Такие традиционные методы включают синтез полимерных матриц, гибридизацию, лигирование и обнаружение гибридизации с использованием метки. Конкретные иллюстрации подходящих методик можно получить, обратившись к приведенному ниже примеру. Однако, разумеется, можно использовать и другие эквивалентные традиционные процедуры. Такие традиционные методики и описания можно найти в стандартных лабораторных руководствах, таких как *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)*, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, *Cells: A Laboratory Manual*, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.) Freeman, Highly stabilized York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach", 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000), Lehninger, *Principles of Biochemistry* 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y. и Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5th Ed., W. H. Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y., все из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

Следует отметить, что использование определений в единственном числе не исключает возможности наличия определений во множественном числе, если обратное прямо не указано в контексте. Так, например, ссылка на "антитело" включает множество таких антител, а ссылка на "клетку-хозяина" включает ссылку на одну или более клеток-хозяев и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и так далее. Следует также отметить, что в формулу изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как "исключительно", "только" и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования "отрицательного" признака.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Все упомянутые в данном документе публикации включены в данный документ посредством ссылки с целью описания и раскрытия устройств, композиций, составов и методик, которые описаны в публикации и которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением.

Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данное изобретение с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

Для обеспечения более полного понимания настоящего изобретения в приведенном выше описании изложены многочисленные конкретные детали. Однако для специалиста в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение может применяться на практике и без одной или более указанных конкретных деталей. В других случаях общеизвестные отличительные признаки и процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники, не были описаны во избежание затруднения понимания изобретения.

Хотя настоящее изобретение описано в основном со ссылкой на конкретные варианты осуществления, также предполагается, что другие варианты осуществления станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия, и предполагается, что такие варианты осуществления включены в способ по настоящему изобретению.

Примеры

Пример 1. Эффективность и безопасность профилактики с использованием рекомбинантного фактора фон Виллебранда (ФВ) при тяжелой форме болезни фон Виллебранда (БВ): дизайн проспективного международного открытого многоцентрового исследования фазы 3.

Введение.

У пациентов с болезнью фон Виллебранда (БВ) нарушен гемостаз из-за количественного или качественного дефицита фактора фон Виллебранда (ФВ), крупного мультимерного гликопротеина плазмы крови с ключевыми гемостатическими функциями, опосредующими агрегацию тромбоцитов и стабилизирующими фактор свертывания крови VIII (FVIII) в системе кровообращения (1-3). У большинства пациентов с БВ наблюдаются легкие или умеренные кровотечения из слизистых оболочек и кровотечения после травм или операций, хотя могут возникать и угрожающие жизни кровотечения, особенно у пациентов с тяжелой формой заболевания (1, 2).

Рекомбинантный ФВ (рФВ, вониког альфа, VEYVONDI™; Baxalta Innovations GmbH, a Takeda company, Вена, Австрия) производится по технологии рекомбинантной ДНК в линии клеток яичника китайского хомячка без добавления экзогенного белка человеческого или животного происхождения (4). ФВ содержит полный профиль мультимеров ФВ, включая сверхкрупные мультимеры, которых обычно не хватает в концентратах ФВ, полученных из плазмы, (пФВ), подвергнутых воздействию ADAMTS13, расщепляющей ФВ протеазы (5-7).

Пациентам с тяжелой формой БВ может быть полезно профилактическое лечение рФВ для поддержания уровня ФВ и FVIII, чтобы снизить риск эпизодов спонтанного кровотечения (ЭК), включая гемартроз, эпистаксис и кровотечения из желудочно-кишечного тракта (8-13).

Снижение частоты и продолжительности ЭК, вероятно, уменьшает потребность в переливании эритроцитов и снижает риск развития изнурительных сопутствующих заболеваний, включая артропатию (8,9)

Цели клинического исследования

Целью исследования было изучить эффективность и безопасность длительного профилактического лечения рФВ у пациентов с тяжелой формой БВ.

Дизайн исследования.

В данном документе описывается глобальное многоцентровое открытое исследование фазы 3 (NCT02973087, EudraCT, № 2016-001478-14) для проспективной оценки эффективности, безопасности и фармакокинетики непрерывного профилактического лечения рФВ у взрослых пациентов с тяжелой формой БВ (исходная ристоцетин-кофакторная активность ФВ [ФВ:КР] <20 МЕ/дл), которым требовалась терапия пФВ для контроля ЭК в течение года до регистрации (Фиг 1).

Пациенты относятся к 1 или 2 когортам, в зависимости от типа схемы ФВ, полученного до включения в исследование: лечение по необходимости (когорта "лечения по необходимости") и профилактическое лечение препаратом пФВ (когорта "с заменой препарата"). Пациенты обеих когорт будут получать профилактическое лечение рФВ в течение 1 года.

Пациенты.

Пациенты в возрасте ≥ 18 лет с диагнозом тяжелой формы БВ (исходный уровень ФВ:КР <20 МЕ/дл), требующей лечения ФВ для контроля кровотечения (основные критерии включения в исследование подробно представлены на фиг. 2) Протокол исследования был одобрен соответствующим локальным этическим комитетом, и все пациенты предоставили письменное информированное согласие перед включением в исследование.

Исследуемое лечение.

Пациенты получали профилактику рФВ, как описано ниже.

Для когорты лечения по необходимости стандартную профилактическую дозу 50 ± 10 МЕ/кг рФВ:КР вводили путем внутривенной инфузии. Доза может быть увеличена до 80 МЕ/кг.

Все пациенты получали дозу два раза в неделю (фиг. 3, схема А).

Для когорты с заменой препарата еженедельная доза рФВ, эквивалентная $\pm 10\%$ от еженедельной дозы пФВ, получаемой ранее, была разделена на 2 внутривенные инфузии (фиг. 3, схема А), максимум 80 МЕ/кг на одну инфузию. Еженедельную дозу вводили в виде 3 инфузий (фиг. 3, схема В), в соответствии с клиническим заключением; дозу один раз в неделю разрешали только в том случае, если пациент ранее получал дозу пФВ один раз в неделю.

Доза рФВ может быть дополнительно персонализирована с указанным диапазоном на основе фармакокинетических данных, истории ЭК и результатов клинических и лабораторных оценок. Пациенты с ЭК, которые требуют лечения ФВ, получали рФВ для лечения кровотечения. Доза с поправкой на массу должна основываться на типе и тяжести ЭК и соответствующих клинических и лабораторных показателях. Рекомбинантный FVIII (антигемофильный фактор [рекомбинантный] [ADVATE; Baxalta US Inc., компания Takeda, Лексингтон, штат Массачусетс]) был бы введен, если бы немедленное повышение уровня FVIII было клинически показано.

Пациенты, которым во время исследования потребовалось проведение плановых операций или стоматологических процедур, получали рФВ для купирования операционного кровотечения, а затем возобновляли профилактическое лечение рФВ. Перед операцией рФВ вводили без рекомбинантного FVIII, если уровень активности FVIII (FVIII:C) находился на рекомендуемом целевом уровне: $\geq 0,4$ МЕ/мл для малой или стоматологической операции и $\geq 0,8$ МЕ/мл для большой операции.

Критерии эффективности в исследовании и статистический анализ.

Основные критерии эффективности в исследовании перечислены на фиг. 4 (табл. 3).

Статистический анализ включал примерно 22 пациента, в том числе по меньшей мере 5 пациентов с БВ 3 типа и по меньшей мере 8 пациентов в каждой исследуемой когорте; формальных расчетов размера выборки не производили.

Первичный анализ эффективности проводили на всех пациентах, которые получали профилактическое лечение рФВ. ГЧК для спонтанных кровотечений будут оценивать с помощью отрицательной биномиальной регрессии для каждой когорты исследования (когорта "лечения по необходимости" или когор-

та "с заменой препарата"). Сравнение ГЧК для спонтанных кровотечений до исследования и во время исследования было основано на пациентах из когорты "с заменой препарата". Для оценки будет использована обобщенная линейная модель со смешанными эффектами. Коэффициент ГЧК был представлен с 2-сторонним 95% доверительным интервалом для каждой когорты исследования.

Статус исследования и заключение.

Включение участников в исследование завершено.

По результатам этого проспективного исследования фазы 3 представлены данные об эффективности и безопасности рФВ для профилактики спонтанных кровотечений у пациентов с тяжелой формой БФ.

Период исследования профилактического лечения рФВ составил 1 год, а основным критерием эффективности является ГЧК для спонтанных (нетравматических) кровотечений.

Первичные критерии эффективности.

Проспективно зарегистрированная годовая частота кровотечений (ГЧК) в отношении эпизодов спонтанного (не связанных с травмой) кровотечения во время профилактического лечения (рФВ) и историческая ГЧК участников в отношении эпизодов спонтанного кровотечения во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Пересмотренные вторичные критерии эффективности

Количество участников с уменьшением годовой частоты кровотечений (ГЧК) для эпизодов спонтанного (не связанных с травмой) кровотечения во время профилактики по сравнению с собственной исторической ГЧК участников во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Количество участников без кровотечений во время профилактического лечения рекомбинантным фактором фон Виллебранда (рФВ) (временные рамки: приблизительно 1 год).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE в месяц во время профилактического лечения, а также во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE в год во время профилактического лечения, а также во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Общее потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE в месяц с поправкой на массу во время профилактического лечения, а также во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Общее потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE в год с поправкой на массу во время профилактического лечения, а также во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Частота возникновения тромбоэмболических явлений (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Частота возникновения тяжелых реакций гиперчувствительности (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Количество участников, у которых образовались нейтрализующие антитела к рекомбинантному фактору фон Виллебранда (рФВ) и фактору VIII (FVIII) (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Количество участников, у которых образовались общие связывающие антитела к рекомбинантному фактору фон Виллебранда (рФВ) и фактору VIII (FVIII) (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Количество участников, у которых образовались антитела к белкам яичника китайского хомячка (СНО), иммуноглобулину G (IgG) мыши и рекомбинантному фурину (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Фармакокинетика - постепенное восстановление (ПВ) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - конечный период полужизни ($T_{1/2}$) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - среднее время удержания (MRT) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - площадь под фармакокинетической кривой/доза (AUC/доза) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - площадь под фармакокинетической кривой первого момента/доза (AUMC/доза) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - объем распределения в равновесном состоянии (V_{ss}) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - клиренс (CL) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE (rFVIII) на один эпизод спонтанного кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE (rFVIII) на один эпизод травматического кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE (rFVIII) с поправкой на массу на один эпизод спонтанного кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE (rFVIII) с поправкой на массу на один эпизод травматического кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Общая оценка гемостатической эффективности при остановке кровотечения (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев). Использовали 4-балльную шкалу: Отлично, Хорошо, Умеренно, Отсутствует.

Интраоперационная фактическая кровопотеря по сравнению с прогнозируемой - если требуется операция (временные рамки: 0-й день (по завершению операции)). Оценивается оперирующим хирургом по завершению операции.

Интраоперационная гемостатическая эффективность - если требуется операция (временные рамки: 0-й день (по завершению операции)). Оценка по шкале: отлично, хорошо, умеренно или отсутствует - оценивается оперирующим хирургом по завершению операции.

Для плановой операции: общая оценка гемостатической эффективности через 24 часа и на 7-й и 14-й день после последней периоперационной инфузии рФВ (временные рамки: 24 часа и на 7-й и 14-й день после последней периоперационной инфузии рФВ). Оценка по шкале отлично, хорошо, умеренно или отсутствует.

Суточная интра- и послеоперационная доза с поправкой на массу (временные рамки: 0-й день (день операции) - послеоперационный 14-й день). Суточная интра- и послеоперационная доза рФВ с поправкой на массу или без ADVATE.

Исходные вторичные критерии эффективности.

Количество участников с уменьшением годовой частоты кровотечений (ГЧК) для эпизодов спонтанного (не связанных с травмой) кровотечения во время профилактики по сравнению с собственной исторической ГЧК участников во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Количество участников без кровотечений во время профилактического лечения рекомбинантным фактором фон Виллебранда (рФВ) (временные рамки: приблизительно 1 год).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE в месяц во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE в год во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Общее потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE с поправкой на массу в месяц во время лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Общее потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) и ADVATE с поправкой на массу за год лечения по необходимости (временные рамки: приблизительно 1 год).

Частота возникновения тромбоемболических явлений (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Частота возникновения тяжелых реакций гиперчувствительности (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Количество участников, у которых образовались нейтрализующие антитела к рекомбинантному фактору фон Виллебранда (рФВ) и фактору VIII (FVIII) (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Количество участников, у которых образовались общие связывающие антитела к рекомбинантному фактору фон Виллебранда (рФВ) и фактору VIII (FVIII) (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Количество участников, у которых образовались антитела к белкам яичника китайского хомячка (СНО), иммуноглобулину G (IgG) мыши и рекомбинантному фурину (временные рамки: в течение всего периода исследования около 22 месяцев).

Фармакокинетика - постепенное восстановление (ПВ) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - конечный период полужизни (T_{1/2}) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - среднее время удержания (MRT) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - площадь под фармакокинетической кривой/доза (AUC/доза) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - площадь под фармакокинетической кривой первого момента/доза (AUMC/доза) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - объем распределения в равновесном состоянии (V_{ss}) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Фармакокинетика - клиренс (CL) (временные рамки: 30 минут до инфузии; и после инфузии через 30 минут и 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часа).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (pФВ) и ADVATE (rFVIII) на один эпизод спонтанного кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Количество инфузий рекомбинантного фактора фон Виллебранда (pФВ) и ADVATE (rFVIII) на один эпизод травматического кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (pФВ) и ADVATE (rFVIII) с поправкой на массу на один эпизод спонтанного кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Потребление рекомбинантного фактора фон Виллебранда (pФВ) и ADVATE (rFVIII) с поправкой на массу на один эпизод травматического кровотечения (ЭК) (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев).

Общая оценка гемостатической эффективности при остановке кровотечения (временные рамки: в течение всего периода исследования, примерно до 22 месяцев). Использовали 4-балльную шкалу: Отлично, Хорошо, Умеренно, Отсутствует.

Ссылки.

1. Nichols WL, et al., Haemophilia 2008; 14:171-232.
2. Leebeek FW, Eikenboom JC. N Engl J Med 2016; 375:2067-80.
3. Reiningger AJ. Hamostaseologie 2015; 35:225-33.
4. European Medicines Agency. VEYVONDI Summary of Product Characteristics. https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/veyvondi-epar-product-information_en.pdf.
5. Mannucci PM et al., Blood 1994; 83:3018-27.
6. Turecek PL et al., Hamostaseologie 2009; 20(suppl 1):S32-8.
7. Favaloro EJ., Blood Transfus. 2016;14:262-76.
8. Abshire T., Thromb Res 2009; 124(suppl 1):S15-9.
9. Berntorp E., Haemophilia 2008; 14(suppl 5):47-53.
10. Berntorp E., Petrini P., Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16(suppl 1):S23-6.
11. Berntorp E., Semin Thromb Hemost 2006; 32:621-5.
12. Abshire TC, et al., Haemophilia 2013; 19:76-81.
13. Abshire T et al., J Thromb Haemost 2015; 13:1585-9.

Несмотря на то что в данном документе были показаны и описаны иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, могут применяться при практическом осуществлении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения и, что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и их эквивалентов.

Приведенные выше примеры предоставлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать варианты осуществления композиций, систем и способов по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Модификации вышеописанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в данной области техники, входят в объем нижеприведенной формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в описании, указывают на уровень квалификации специалистов в области техники, к которой относится изобретение. Все ссылки, процитированные в данном описании, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была включена посредством ссылки полностью индивидуально.

Все заголовки и обозначения разделов используются только для ясности и справочных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области техники оценят полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описанного в данном документе.

Все ссылки, процитированные в данном документе, тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдель-

ная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Многие модификации и вариации данной заявки могут быть выполнены без отклонения от ее сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в данном документе, предлагаются только в качестве примера, и приложение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, которые ею охвачены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ профилактического лечения эпизодов спонтанного кровотечения у субъекта с тяжелой формой болезни фон Виллебранда (БВ), включающий введение субъекту два раза в неделю по меньшей мере одной дозы рекомбинантного фактора фон Виллебранда (рФВ) в диапазоне от 40 МЕ/кг до 80 МЕ/кг, снижая таким образом частоту и/или продолжительность эпизодов спонтанного кровотечения.

2. Способ по п.1, в котором по меньшей мере одна доза рФВ составляет от по меньшей мере около 50 МЕ/кг до около 80 МЕ/кг.

3. Способ по п.1 или 2, в котором субъект имеет исходный уровень ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:КР) в диапазоне от 20 МЕ/дл или менее, или у него диагностирована БВ типа 1.

4. Способ по п.1 или 2, в котором у субъекта диагностирована БВ типа 2А, 2В или 2М.

5. Способ по п.1 или 2, в котором субъект имеет содержание антигена ФВ (ФВ:Аг) в диапазоне от 3 МЕ/дл или менее, или у него диагностирована БВ типа 3.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором субъект получал профилактическое лечение полученным из плазмы ФВ (пФВ) в течение последних 12 месяцев до первоначального введения рФВ.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором субъект пережил по меньшей мере 3 эпизода спонтанного кровотечения в течение последних 12 месяцев.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором введение выполняют каждые 3-4 дня.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором введение выполняют в 1-й день и на 5-й день, 2-й день и 6-й день или 3-й день и 7-й день 7-дневного периода.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором введение выполняют по меньшей мере каждые 72 часа или 84 часа.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором введение выполняют по меньшей мере каждые 72 часа.

12. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно включающий введение субъекту по меньшей мере одной дозы рекомбинантного фактора VIII (rFVIII).

13. Способ по п.12, в котором введение по меньшей мере одной дозы rFVIII выполняют одновременно или последовательно с введением по меньшей мере одной дозы рФВ.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем субъект возобновляет профилактическое лечение после проведения плановой операции или стоматологической операции.

15. Способ по п.14, в котором, если плановая операция является малой операцией или стоматологической операцией, а активность FVIII (FVIII:C) у субъекта составляет по меньшей мере 0,4 МЕ/мл или больше, субъекту перед операцией вводят рФВ без rFVIII.

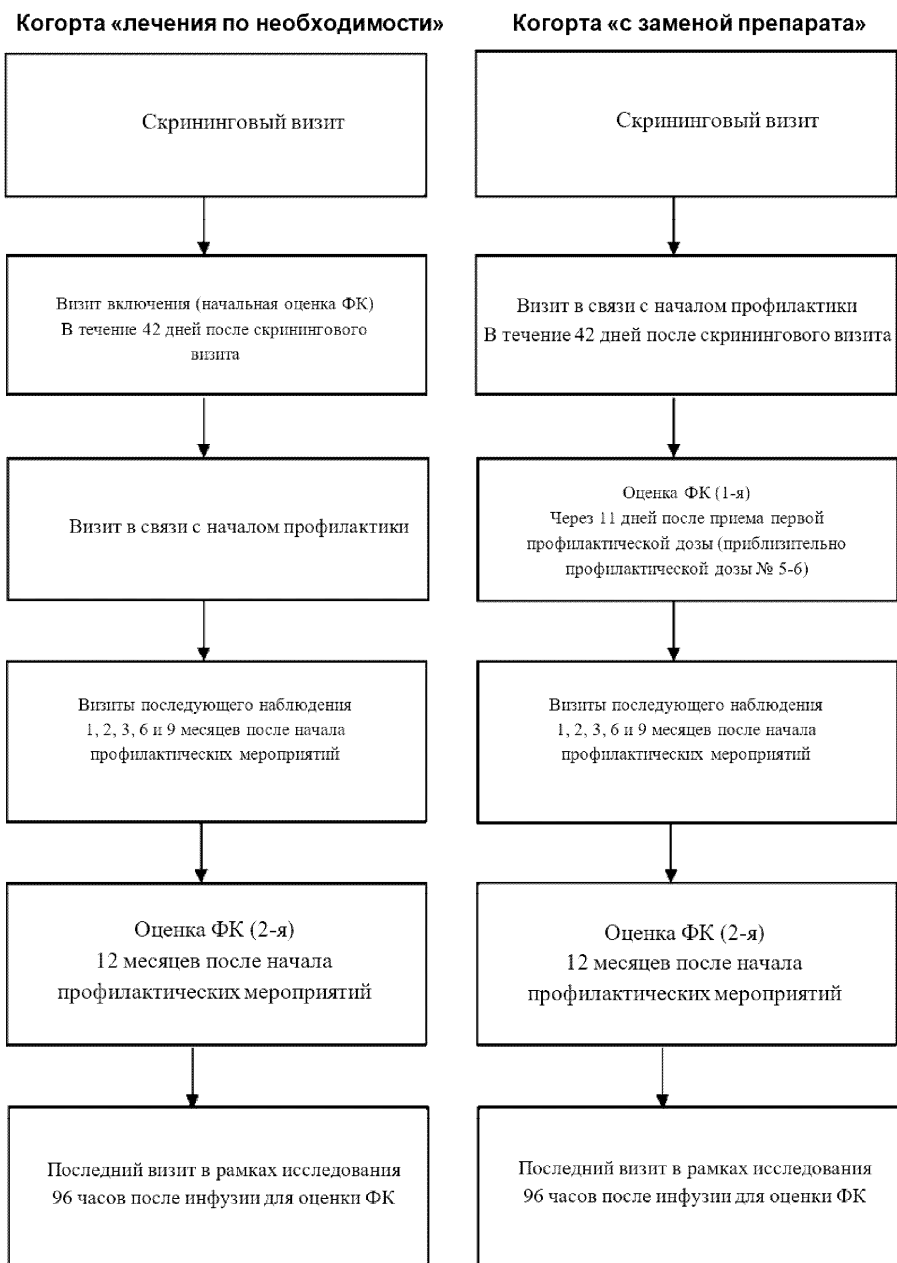
16. Способ по п.14, в котором, если плановая операция является большой операцией, а активность FVIII (FVIII:C) у субъекта составляет по меньшей мере 0,8 МЕ/мл или выше, субъекту вводят рФВ без rFVIII перед операцией.

17. Способ по любому из пп.1-16, в котором каждая отдельная инфузия содержит 80 МЕ/кг рФВ.

18. Способ по любому из пп.1-16, в котором каждая отдельная инфузия содержит 50 МЕ/кг рФВ.

19. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем спонтанное кровотечение включает любое, выбранное из группы, состоящей из гемартроза, эпистаксиса, кровотечения из мышц, кровотечения из полости рта и кровотечения из желудочно-кишечного тракта.

20. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем у субъекта не диагностирована БВ типа 2N или псевдо БВ.



ФК, фармакокинетика.

Фиг. 1

Основные критерии включения и невключения из исследования

Критерии включения	Критерий невключения
<p>Документально подтвержденный диагноз тяжелой формы БВ: БВ типа 1 (ФВ:КР <20 МЕ/дл) или типа 2А (подтвержденный по профилю мультимеров), типа 2В (диагностированный по геотипу), типа 2М, или Типа 3 (ФВ:Аг ≤3 МЕ/дл) Диагноз БВ, подтвержденный при помощи генетического тестирования и анализом мультимеров, зафиксированный в истории болезни или при скрининге Пациенты из когорты «с заменой на пФВ», получавшие профилактическое лечение препаратами пФВ в течение ≥12 месяцев до скрининга Пациенты из когорты «лечения по необходимости», которые в настоящее время получают лечение «по необходимости», для которых исследователем рекомендовано профилактическое лечение Пациенты из когорты «лечения по необходимости», у которых в течение предыдущих 12 месяцев было ≥3 документированных спонтанных кровотечения (не включая меноррагию), требующих лечения ФВ</p>	<p>Диагноз БВ типа 2N, псевдо БВ или другого наследственного или приобретенного нарушения свертывания крови, кроме БВ. В настоящее время получает профилактическое лечение в виде >5 инфузий в неделю В настоящее время получает профилактическое лечение с еженедельной дозой >240 МЕ/кг История или наличие ингибитора ФВ на момент скрининга Известная повышенная чувствительность к любому из компонентов исследуемых лекарственных средств, например, к мышьяным или хомячьим белкам</p>
<p>пФВ – полученный из плазмы фактор фон Виллебранда; БВ – болезнь фон Виллебранда; ФВ - фактор фон Виллебранда; ФВ:КР, ристоцетин-кофакторная активность фактора фон Виллебранда; ФВ:Аг, антиген фактора фон Виллебранда.</p>	

Фиг. 2

Примерные схемы дозирования для профилактики рФВ

Схема	Пн	Вт	Ср	Чт	Пт	Сб	Вс	Пн	Вт	Ср	Чт	Пт	Сб	Вс
А	✓				✓			✓				✓		
В	✓		✓			✓		✓		✓			✓	

Фиг. 3

Основные критерии эффективности в исследовании

Тип	Критерий
Первичные	<ul style="list-style-type: none"> ГЧК в отношении спонтанных КЭ (т.е. КЭ, не связанных с травмой) во время профилактического лечения с использованием рФВ
Вторичные	<p>Эффективность</p> <ul style="list-style-type: none"> Доля пациентов в когорте «лечения по необходимости», достигших снижения ГЧК на $\geq 25\%$ при спонтанных ЭК во время профилактики рФВ по сравнению с их ГЧК до исследования Доля пациентов из когорты «с заменой препарата», достигших ГЧК для спонтанных ЭК во время профилактики рФВ, не превышающего ГЧК, полученной до исследования во время профилактического лечения пФВ ГЧК для спонтанных ЭК по месту возникновения кровотечения во время профилактического лечения рФВ Категоризированная ГЧК для спонтанных ЭК, определяемая как 0, 1–2, 3–5 или >5 ЭК в течение 12 месяцев профилактического лечения рФВ Общее и среднее количество инфузий рФВ в неделю во время профилактического лечения Общее потребление рФВ с поправкой на массу во время профилактического лечения <p>Безопасность</p> <ul style="list-style-type: none"> Нежелательные явления – частота возникновения, степень тяжести и связь с исследуемым препаратом Тромбоэмболические явления Реакции гиперчувствительности Образование нейтрализующих антител к ФВ и FVIII Образование общих связывающих антител к ФВ и FVIII Образование связывающих антител к белкам яичника китайского хомячка, иммуноглобулину G мыши и рекомбинантному фурину Клинически значимые изменения показателей жизненно важных функций и клинических лабораторных параметров по сравнению с исходным уровнем <p>ФК и ФД параметры</p> <ul style="list-style-type: none"> ФК и ФД параметры (когорты «лечения по необходимости») и параметры в равновесном состоянии (когорты «лечения по необходимости» и «с заменой препарата») <ul style="list-style-type: none"> ФК параметры: на основе профилей активности ФВ:КР, ФВ:Аг и коллаген-связывающей способности ФВ в зависимости от времени ФД параметры: на основе FVIII:С, измеренного с помощью 1-стадийного анализа свертывания крови в зависимости от времени
Поисковые	<ul style="list-style-type: none"> Будет проведена оценка параметров качества жизни, связанных со здоровьем
<p>ГЧК – годовая частота кровотечений; ЭК, эпизод кровотечения; FVIII – фактор VIII; FVIII:С, активность FVIII; ФД – фармакодинамика; пФВ – полученный из плазмы фактор фон Виллебранда; ФК – фармакокинетика; рФВ – рекомбинантный фактор фон Виллебранда; ФВ:КР, ристоцетин-кофакторная активность фактора фон Виллебранда; ФВ:Аг, антиген фактора фон Виллебранда.</p>	

Фиг. 4

SEQ ID NO:1

agctcacagc	tattgtgggt	gaaagggag	ggtggttgg	ggatgtcaca	gcttgggctt	60
tatctccccc	agcagtgagg	actccacagc	ccctgggcta	cataacagca	agacagtccg	120
gagctgtagc	agacctgatt	gagcctttgc	agcagctgag	agcatggcct	aggggtgggcg	180
gcaccattgt	ccagcagctg	agtttcccag	ggaccttgg	gatagccgca	gccctcattt	240
gcaggggaag	atgattcctg	ccagatttgc	cggggtgctg	cttgcctcgg	ccctcatttt	300
gccagggacc	ctttgtgcag	aaggaactcg	cggcaggtca	tccacggccc	gatgcagcct	360
tttcggaagt	gacttcgtca	acacctttga	tgggagcatg	tacagctttg	cgggatactg	420
cagttacctc	ctggcagggg	gctgccagaa	acgctccttc	tcgattattg	gggacttcca	480
gaatggcaag	agagtgaacc	tctccgtgta	tcttggggaa	ttttttgaca	tccatttgtt	540
tgtaaatggt	accgtgacac	agggggacca	aaagtctccc	atgccctatg	cctccaaagg	600
tggtatgcta	gaaactgagg	ctgggtacta	caagctgtcc	ggtgaggcct	atggctttgt	660
ggccaggatc	gatggcagcg	gcaactttca	agtccctgctg	tcagacagat	acttcaacaa	720
gacctgcccg	ctgtgtggca	actttaacat	ctttgctgaa	gatgacttta	tgaccaaga	780
agggaccttg	acctcggacc	cttatgactt	tgccaaactca	tgggctctga	gcagtggaga	840
acagtgggtg	gaaaggccat	ctcctcccag	caactccttc	aaactcctcc	ctggggaaat	900
gcagaagggc	ctgtgggagc	agtgccagct	tctgaagagc	acctcgggtg	ttgcccgctg	960
ccacctcctg	gtggaccctg	agccttttgg	ggccctgtgt	gagaagactt	tggtgtgagt	1020
tgctgggggg	ctggagtgccg	cctgccctgc	cctcctggag	tacgcccggg	cctgtgccca	1080
ggagggaaat	gtgctgtacg	gctggaccga	ccacagccgg	tgcagcccag	tgtgccctgc	1140
tggtatggag	tataggcagt	gtgtgtcccc	ttgcgcccag	acctgccaga	gcctgcacat	1200
caatgaaatg	tgtcaggagc	gatgcttgga	tgctgcagc	tgccctgagg	gacagctcct	1260
ggatgaaggc	ctctgcgtgg	agagcaccga	gtgtccctgc	gtgcattccg	gaaagcgcta	1320
ccctcccggc	acctccctct	ctcgagactg	caacaactgc	atttgcccga	acagccagtg	1380
gatctgcagc	aatgaaagaat	gtccagggga	gtgccttgtc	acaggtcaat	cacacttcaa	1440
gagctttgac	aacagatact	tcaccttcag	tggatctgct	cagtacctgc	tggcccggga	1500
ttgccaggac	cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgctg	atgaccgcca	1560
cgctgtgtgc	acctgcctccg	tcacctcccg	gctgcctggc	ctgcacaaac	gccttgtgaa	1620
actgaaqcac	ggggcagggg	ttgccatgga	tggccaggac	gtccagctcc	ccctcctgaa	1680
aggtgacctc	cgcatccagc	atacagtgac	ggcctccgtg	cgccctcagct	acggggagga	1740
cctgcagatg	gactgggatg	gccgcccggg	gctgctggtg	aaactgtccc	ccgtctatgc	1800
cggggaagacc	tgcggcctgt	gtgggaatta	caatggcaac	cagggccagc	acttccctac	1860
ccctctctgg	ctggcggagc	ccgggtgga	ggacttcggg	aacgcttggg	agctgcacgg	1920
ggactgcacg	gacctgcaga	agcagcaacg	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcatgac	1980
caggttctcc	gaggaggcgt	gcgcggtcct	gacgtcccc	acattcaggg	cctgccatcg	2040
tgccctcagc	ccgctgccct	acctgcggaa	ctgcgctac	gacgtgtgct	cctgctcgga	2100
cgcccgcgag	tgctgtgccc	gcgcccctggc	caactatgcc	gcggcctcgc	cggggagagg	2160
cgctgcgctc	gcgtggcggc	agccaggccc	ctgtgagctg	aaactgcccga	aaggccaggt	2220
gtacctgcag	tgcgggaacc	ectgcaacct	gacctgecgc	tctctctctt	accggatgta	2280
ggaatgcaat	gaggcctgcc	tggaggcctg	cttctgcccc	ccagggtcct	acatggatga	2340
gaggggggac	tgctgtccca	aggcccagtg	ccctgtttac	tatgacggtg	agatcttcca	2400
gccagaagac	atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggaag	gcttcatgca	2460
ctgtaccatg	agtggagctc	ccggaagcct	gctgcctgac	gctgtcctca	gcagtcccct	2520
gtctcatcgc	agcaaaaagg	gectatcctg	tcggcccccc	atggccaagc	tgggtgtctc	2580
cgctgacac	ctgcgggctg	aaaggctcga	gtgtaccaaa	acgtgccaga	actatgacct	2640
ggagtgcatt	agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	cccccgggca	tggctccggca	2700
tgagaacaga	tgtgtggccc	tggaaaagtg	tcctgctctc	catcagggca	aggagtatgc	2760
ccctggagaa	acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgctgggacc	ggaagtggaa	2820
ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccaagctg	ctccacgac	ggcatggccc	actacctcac	2880
cttcgacggg	ctcaaatacc	tgttccccgg	ggagtgccag	tacgttctgg	tgcaagatta	2940
ctgcggcagt	aaacctggga	cctttcggat	cctagtgggg	aaataaggat	gcagccaccc	3000
ctcagtgaaa	tgcaagaaac	gggtcaccat	cctggtggag	ggaggagaga	ttgagctgtt	3060
tgacggggag	gtgaaatgta	agagggccat	gaaggatgag	actcactttg	aggtgggtgga	3120
gtctggcccg	tacatcatte	tgctgctggg	caaaagccctc	tccgtggtct	gggaccgcca	3180
cctgagcatc	tccgtgtgct	tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	gcctgtgtgg	3240
gaattttgat	ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aaactccaag	tggaggaaga	3300
ccctgtggac	tttggaaact	cctgaaaggt	gagctcgcag	tgtgctgaca	ccagaaaagt	3360
gcctctggac	tcatcccctg	ccacctgcca	taacaacatc	atgaagcaga	cgatggtgga	3420

Фиг. 5А

ttcctcctgt	agaatcctta	ccagtgacgt	cttccaggac	tgcaacaagc	tggtggacc	3480
cgagccat	ctggatgtct	gcatttacga	cacctgctcc	tgtgagtcca	ttggggactg	3540
cgctcgtttc	tgcgacacca	ttgctgccta	tgcccacgtg	tgtgcccagc	atggcaaggt	3600
ggtgacctgg	aggacggcca	catgtgtccc	ccagagctgc	gaggagagga	atctccggga	3660
gaacgggtat	gagtggtgag	ggcgctataa	cagctgtgca	cctgcctgtc	aagtcaactg	3720
tcagcacctc	gagccactgg	cctgcctgtg	gcagtggtg	gagggctgcc	atgcccactg	3780
ccctccaggg	aaaatcctgg	atgagctttt	gcagacctgc	gttgacctg	aagactgtcc	3840
agtgtgtgag	gtggctggcc	ggcgttttgc	ctcaggaaag	aaagtacact	tgaatcccag	3900
tgacctgtag	cactgccaga	tttgccactg	tgatgttgtc	aacctcacct	gtgaagcctg	3960
ccagggaccg	ggaggcctgg	tggtgcctcc	caagatgtcc	ccggtgagcc	ccaccactct	4020
gtatgtggag	gacatctcgg	aaccgcctgt	gcacgatttc	tactgcagca	ggctactgga	4080
cctggctctc	ctgctggatg	gctcctccag	gctgtccag	gctgagtttg	aaagtgtgaa	4140
ggcctttgtg	gtggacatga	tgagcggcct	gcgcactctcc	cagaagtggg	tcgcgctggc	4200
cgtygtggag	taccacgacg	gctcccacgc	ctacatcggg	ctcaaggacc	ggaagcgacc	4260
gtcagagctg	cgcgccattg	ccagccaggt	gaagtatgcg	ggcagccag	tggcctccac	4320
cagcgaggtc	ttgaaataca	cactgttcca	aatcttcagc	aagatcgacc	gcctgaagc	4380
ctcccgcac	accctgtctc	tgatggccag	ccaggagccc	caacggatgt	cccggaaact	4440
gtcccgtac	gtcccgggct	tgaagaagaa	gaaggtcatt	gtgatcccgg	tgggcatggg	4500
gcccctatgcc	aacctcaagc	agatccgcct	catcgagaag	caggcccttg	agaaccaaggc	4560
cttcgtgctg	ageagtgtgg	atgagctgga	gcagcaaaag	gacgagatcg	ttagctacct	4620
ctgtgacctt	gcccctgaag	cccctcctcc	tactctgccc	cccgacatgg	cacaagtcc	4680
tgtgggcccc	gggctcttgg	gggtttcgac	cctggggccc	aagaggaaact	ccatggttct	4740
ggatgtggcg	ttcgtctcgg	aaaggtcggg	caaaatgtgt	gaagccgact	tcaacaggag	4800
caagggatcc	atggaggagg	tgattcaggg	gatggatgtg	ggccaggaca	gcattccact	4860
cacgggtgctg	cagtactcct	acatgggtgac	tgtggagtac	cccttcagcg	aggcacagtc	4920
caaaaggggac	atcctgcagc	gggtgcgaga	gatccgctac	cagggcgcca	acaggacca	4980
cactgggctg	gcctgcgggt	acctctctga	ccacagcttc	ttggctagcc	agggtgaccg	5040
ggagcaggcg	cccaacctgg	tctacatgg	cacoggaaat	cctgcctctg	atgagatcaa	5100
gaggtgctcct	ggagacatcc	aggtggtgcc	catgtgagtg	ggccctaagt	ccaacgtgca	5160
ggagctggag	aggattggct	ggcccattgc	ccctatcctc	atccaggact	ttgagacgct	5220
cccccgagag	gctcctgacc	tggtgctgca	gaggtgctgc	tcgggagagg	ggctgcagat	5280
ccccaccctc	tcacctgcac	ctgactgcag	ccagcccctg	gacgtgatcc	ttctcctgga	5340
tggtggcctc	agtttcccag	cttcttattt	tgatgaaatg	aaaggtttcg	ccaaggcttt	5400
catttcaaaa	gccaatatag	ggcctcgtct	cactcaggtg	tcagtgtctg	agtatggaag	5460
catcaccacc	attgacgtgc	catggaacct	ggtcccggag	aaagcccatt	tgtctgagct	5520
tgtggacgtc	atgcagcggg	agggagggcc	cagccaaatc	ggggatgcct	tgggctttgc	5580
tgtgcgatac	ttgacttcag	aaatgcatgg	tgccaggccc	ggagcctcaa	aggcgtgggt	5640
catcctggct	acggacgtct	ctgtggatcc	agtggatgca	gcagctgatg	ccgccagggtc	5700
caacagagtg	acagtgttcc	ctattggaat	tgagatcgc	tacgatgcag	cccagctacg	5760
gatcttgcca	ggcccagcag	gcgactccaa	cgtggtgaag	ctccagcgaa	tcgaagacct	5820
ccctaccatg	gtcaccttgg	gcaattcctt	cctccacaaa	ctgtgctctg	gatttgttag	5880
gattttgcatg	gatgaggatg	ggaatgagaa	gagggcccggg	gacgtctgga	ccttgccaga	5940
ccagtgccac	accgtgactt	gccagccaga	tgccagacc	ttgctgaaga	gtcatcgggt	6000
caactgtgac	cgggggctga	ggcctctcgtg	ccctaacagc	cagtcccctg	ttaaagtgga	6060
agagacctgt	ggctgcccgt	ggacctgccc	ctgcgtgtgc	acaggcagct	ccactcggca	6120
catcgtgacc	tttgatgggc	agaatttcaa	gctgactggc	agctgttctt	atgtcctatt	6180
tcaaaacaag	gagcaggacc	tgagggtgat	tctccataat	ggtgcttcca	gcctggagc	6240
aaagcagggc	tgcatgaaat	ccatcgaggt	gaagcacagt	gcccctcccg	tcgagctgca	6300
cagtgcactg	gaggtgacgg	tgaaatggag	actggtctct	gttctctacg	tgggtgggaa	6360
catggaagtc	aacgtttatg	gtgccatcat	gcatgaggtc	agattcaatc	accttgggtca	6420
catcttcaca	ttcactccac	aaaacaatga	gttccaactg	cagctcagcc	ccaagacttt	6480
tgcttcaaa	acgtatggtc	tgtgtgggat	ctgtgatgag	aacggagcca	atgacttcat	6540
gctgagggat	ggcacagtca	ccacagactg	gaaaaactt	gttcaggaa	ggactgtgca	6600
ggggccaggg	cagacgtgcc	agcccactct	ggaggagcag	tgtcttgtcc	ccgacagctc	6660
ccactgccc	gtcctcctct	taccactggt	tgctgaaatg	cacaaggctc	tggctccagc	6720
cacattctat	gcatctgccc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggtgat	6780
cgctcttat	gcccactctct	gtcggaccac	cggggtctgc	gttgactgga	ggacacctga	6840
ttctgtgct	atgtcatgcc	caccatctct	ggtctacaac	cactgtgagc	atggctgtcc	6900
ccggcactgt	gatggcaacg	tgagctcctg	tggggaccat	ccctccgaag	gctgtttctg	6960

Фиг. 5В

ccctccagat	aaagtcatgt	tggaaaggcag	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	7020
cattggtgag	gatggagttc	agcaccagtt	cctggaagcc	tgggtcccgg	accaccagcc	7080
ctgtcagatc	tgccacatcc	tcagccggcg	gaaggtcaac	tgcaacaacg	agccctgcc	7140
cacggcca	gctcccacgt	gtggcctgtg	tgaagtagcc	cgctcccgc	agaatgcaga	7200
ccagtgctgc	cccagatag	agtgtgtgtg	tgaccacagtg	agctgtgacc	tgccccagtg	7260
gcctcactgt	gaacgtggcc	tccagccac	actgacaaac	cctggcagtg	gcagacccaa	7320
cttcacctgc	gcctgcagga	aggaggagtg	caaaaagagtg	tccccacct	cctgcccccc	7380
gcaccgtttg	cccacccttc	ggaagaccca	gtgctgtgat	gagtatgagt	gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac	tccacagtga	gctgtccct	tgggtacttg	gcctcaactg	ccaccaatga	7500
ctgtgctgt	accacaacca	cctgccttcc	cgacaaggtg	tggttccacc	gaagcaccat	7560
ctaccctgtg	ggccagttct	gggaggagg	ctgcatgtg	tgcaacctga	ccgacatgga	7620
ggatgccgtg	atgggcctcc	gcgtggccca	gtgctcccag	aagccctgtg	aggacagctg	7680
tccgtcgggc	ttcacttacg	ttctgcatga	aggcagtg	tgtggaaggt	gcctgccatc	7740
tgccctgtgag	gtgggtgactg	gctcaccgcg	gggggactcc	cagtcttcc	ggaagagtg	7800
cgctcaccag	tgggcctccc	cggaacccc	ctgcctcatc	aatgagtg	tccagtgaa	7860
ggaggaggtc	tttatacaac	aaaggaacgt	ctcctgcccc	cagctggagg	tccctgtctg	7920
cccctcgggc	tttcagctga	gctgtaagac	ctcagcgtgc	tgcccaagct	gtcgtgtga	7980
gcgcctggag	gcctgcctgc	tcaatggcac	tgtcattggg	cccgggaaga	ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc	acgacctgcc	gctgcctggt	gcaggtgggg	gtcatctctg	gattcaagct	8100
ggagtgcagg	aagaccacct	gcaaccctg	cccctgggt	tacaaggaag	aaaataaac	8160
aggtgaatgt	tgtgggagat	gtttgcctac	ggcttgacc	attcagctaa	gaggaggaca	8220
gatcaatgaca	ctgaagcgtg	atgagacgt	ccagatggc	tgtgatactc	actctgcaa	8280
ggtcaatgag	agaggagagt	acttctggga	gaagagggtc	acaggctgcc	cacctttga	8340
tgaaacaag	tgtctggctg	agggaggtaa	aattatgaaa	attccaggca	cctgctgtga	8400
cacatgtgag	gagcctgagt	gcaacgacat	cactgccagg	ctgcagtatg	tcaaggtggg	8460
aagctgtaag	tctgaagtag	aggtggatat	ccactactgc	cagggcaaat	gtgccagcaa	8520
agccatgtac	tccattgaca	tcaacgatgt	gcaggaccag	tgtccctgct	gctctccgac	8580
acggacggag	cccattgcagg	tggccctgca	ctgcaccaat	ggctctgttg	tgtaccatga	8640
ggttctcaat	gccatggagt	gcaaatgctc	ccccaggaa	tgacagcaag	gaggctgctg	8700
cagctgcctg	ggtgcctgct	gctgcctgcc	ttggcctgat	ggccaggcca	gagtgctgcc	8760
agtcctctgc	atgttctgct	cttgtgcctt	tctgagccca	caataaaggc	tgagctctta	8820
tcttgcaaaa	ggc					8833

Фиг. 5С

SEQ ID NO:2

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ile Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys
 20 25 30
 Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr
 35 40 45
 Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly Cys Gln Lys
 50 55 60
 Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys Arg Val Ser
 65 70 75 80
 Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu Phe Val Asn
 85 90 95
 Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro Tyr Ala Ser
 100 105 110
 Lys Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys Leu Ser Gly Glu Ala Tyr
 115 120 125
 Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly Asn Phe Gln Val Leu Leu
 130 135 140
 Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn
 145 150 155 160
 Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln Glu Gly Thr Leu Thr Ser
 165 170 175
 Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala Leu Ser Ser Gly Glu Gln
 180 185 190
 Trp Cys Glu Arg Pro Ser Ser Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met
 195 200 205
 Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val
 210 215 220
 Phe Ala Arg Cys His Pro Leu Val Asp Pro Glu Pro Phe Cys Glu Lys
 225 230 235 240
 Thr Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly
 260 265 270
 Trp Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu
 275 280 285
 Tyr Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His
 290 295 300

Фиг. 6А

Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro
 305 310 315 320
 Glu Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys
 325 330 335
 Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser
 340 345 350
 Arg Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser
 355 360 365
 Asn Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe
 370 375 380
 Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr
 385 390 395 400
 Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu
 405 410 415
 Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val
 420 425 430
 Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His
 435 440 445
 Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu
 450 455 460
 Lys Gly Asp Leu Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu
 465 470 475 480
 Ser Tyr Gly Glu Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu
 485 490 495
 Leu Val Lys Leu Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys
 500 505 510
 Gly Asn Tyr Asn Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly
 515 520 525
 Leu Ala Glu Pro Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His
 530 535 540
 Gly Asp Cys Gln Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu
 545 550 555 560
 Asn Pro Arg Met Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr
 565 570 575
 Ser Pro Thr Phe Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr
 580 585 590
 Leu Arg Asn Cys Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu
 595 600 605

Фиг. 6B

Cys Leu Cys Gly Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg
 610 615 620
 Val Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly
 625 630 635
 Gln Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser
 645 650 655
 Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys
 660 665 670
 Phe Cys Pro Pro Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys Ala Gln
 675 680 685

 Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp Ile Phe
 690 695 700
 Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met His Cys
 705 710 715 720
 Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val Leu Ser
 725 730 735
 Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro
 740 745 750
 Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu
 755 760 765
 Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met Ser Met
 770 775 780
 Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg His Glu
 785 790 795 800
 Asn Arg Cys Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala
 805 810 815
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp
 820 825 830
 Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr
 835 840 845
 Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe
 850 855 860
 Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn
 865 870 875 880
 Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro
 885 890 895
 Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu
 900 905 910

Фиг. 6С

Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp
 915 920 925
 Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu
 930 935 940
 Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser
 945 950 955 960
 Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly
 965 970 975
 Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln
 980 985 990
 Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Se
 995 1000 1005
 Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala
 1010 1015 1020
 Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser
 1025 1030 1035
 Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu
 1040 1045 1050
 Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys
 1055 1060 1065
 Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile
 1070 1075 1080
 Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr
 1085 1090 1095
 Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn
 1100 1105 1110
 Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys
 1115 1120 1125
 Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala
 1130 1135 1140
 Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 1145 1150 1155
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu
 1160 1165 1170
 Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly
 1175 1180 1185
 Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile
 1190 1195 1200
 Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu
 1205 1210 1215

Фиг. 6D

Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro
1220						1225					1230			
Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp
1235						1240					1245			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly
1250						1255					1260			
Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe
1265						1270					1275			
Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val
1280						1285					1290			
Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp	Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile
1295						1300					1305			
Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala
1310						1315					1320			
Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu
1325						1330					1335			
Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg
1340						1345					1350			
Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	Gln	Glu
1355						1360					1365			
Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly	Leu
1370						1375					1380			
Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His
1385						1390					1395			
Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu
1400						1405					1410			
Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln
1415						1420					1425			
Arg	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala
1430						1435					1440			
Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly
1445						1450					1455			
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser
1460						1465					1470			
Met	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile
1475						1480					1485			
Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn	Arg	Ser	Lys	Glu	Phe	Met	Glu	Glu	Val
1490						1495					1500			

Фиг. 6E

Ile	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Gly	Gln	Asp	Ser	Ile	His	Val	Thr	Val
1505						1510					1515			
Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr	Met	Val	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Phe	Ser	Glu
1520						1525					1530			
Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Arg
1535						1540					1545			
Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Tyr
1550						1555					1560			
Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	Leu	Val	Ser	Gln	Gly	Asp	Arg	Glu	Gln
1565						1570					1575			
Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Tyr	Met	Val	Thr	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp
1580						1585					1590			
Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Pro	Ile	Gly
1595						1600					1605			
Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Trp
1610						1615					1620			
Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Pro	Arg
1625						1630					1635			
Glu	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Gln	Arg	Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly
1640						1645					1650			
Leu	Gln	Ile	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Ala	Pro	Asp	Cys	Ser	Gln	Pro
1655						1660					1665			
Leu	Asp	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala
1670						1675					1680			
Ser	Tyr	Phe	Asp	Glu	Met	Lys	Ser	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser
1685						1690					1695			
Lys	Ala	Asn	Ile	Gly	Pro	Arg	Leu	Thr	Gln	Val	Ser	Val	Leu	Gln
1700						1705					1710			
Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro
1715						1720					1725			
Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu
1730						1735					1740			
Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg
1745						1750					1755			
Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys
1760						1765					1770			
Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp
1775						1780					1785			
Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro
1790						1795					1800			

Фиг. 6F

047451

Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu
 1805 1810 1815
 Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile
 1820 1825 1830
 Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His
 1835 1840 1845
 Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly
 1850 1855 1860
 Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys
 1865 1870 1875
 His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser
 1880 1885 1890
 His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn
 1895 1900 1905
 Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp
 1910 1915 1920
 Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val
 1925 1930 1935
 Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr
 1940 1945 1950
 Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His
 1955 1960 1965
 Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser
 1970 1975 1980
 Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp
 1985 1990 1995
 Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val
 2000 2005 2010
 Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu
 2015 2020 2025
 Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln
 2030 2035 2040
 Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser
 2045 2050 2055
 Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn
 2060 2065 2070
 Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr
 2075 2080 2085

Фиг. 6G

Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln
 2090 2095 2100
 Pro Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu
 2105 2110 2115
 Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala
 2120 2125 2130
 Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln
 2135 2140 2145
 Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn
 2150 2155 2160
 Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser
 2165 2170 2175
 Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro
 2180 2185 2190
 Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser
 2195 2200 2205
 Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser
 2210 2215 2220
 Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly
 2225 2230 2235
 Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro
 2240 2245 2250
 Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr
 2255 2260 2265
 Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys
 2270 2275 2280
 Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu
 2285 2290 2295
 Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val
 2300 2305 2310
 Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly
 2315 2320 2325
 Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys
 2330 2335 2340
 Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr
 2345 2350 2355
 Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn
 2360 2365 2370
 Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser
 2375 2380 2385

Фиг. 6H

Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro
 2390 2395 2400
 Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln
 2405 2410 2415
 Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu
 2420 2425 2430
 Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro
 2435 2440 2445
 Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu
 2450 2455 2460
 Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val
 2465 2470 2475
 Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val
 2480 2485 2490
 Gly Ser Gln Trp Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg
 2495 2500 2505
 Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro
 2510 2515 2520
 Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys
 2525 2530 2535
 Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu
 2540 2545 2550
 Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val
 2555 2560 2565
 Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly
 2570 2575 2580
 Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn
 2585 2590 2595
 Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys
 2600 2605 2610
 Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly
 2615 2620 2625
 Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly
 2630 2635 2640
 Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe
 2645 2650 2655
 Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys
 2660 2665 2670

Фиг. 6I

Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys
 2675 2680 2685
 Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg
 2690 2695 2700
 Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val
 2705 2710 2715
 Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr
 2720 2725 2730
 Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser
 2735 2740 2745
 Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2750 2755 2760
 Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2765 2770 2775
 Arg Lys Cys Ser Lys
 2780

Фиг. 6J

SEQ ID NO:3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15
 Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
 35 40 45
 Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
 50 55 60
 Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80
 Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
 85 90 95
 Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
 100 105 110
 Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
 115 120 125
 Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
 130 135 140
 Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
 145 150 155 160
 Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
 165 170 175
 Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
 180 185 190
 Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
 195 200 205
 Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
 260 265 270
 Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 275 280 285
 Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
 290 295 300

Фиг. 7А

047451

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 305 310 315 320
 Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
 325 330 335
 Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350
 Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365
 Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430
 Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460
 Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
 465 470 475 480
 Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
 485 490 495
 Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
 500 505 510
 Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala
 515 520 525
 Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu
 530 535 540
 Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 545 550 555 560
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
 565 570 575
 Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
 580 585 590
 Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
 595 600 605
 Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser
 610 615 620

Фиг. 7B

Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655
 Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 660 665 670
 Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
 675 680 685
 Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
 690 695 700
 Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
 705 710 715 720
 Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
 725 730 735
 Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
 740 745 750
 Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly
 755 760 765
 Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
 770 775 780
 Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
 785 790 795 800
 Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
 805 810 815
 Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
 820 825 830
 Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
 835 840 845
 Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
 850 855 860
 Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
 865 870 875 880
 Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
 885 890 895
 Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu
 900 905 910
 Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp
 915 920 925

Фиг. 7С

047451

Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
 930 935 940
 Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
 945 950 955 960
 Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
 965 970 975
 Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu
 980 985 990
 Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly
 995 1000 1005
 Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His
 1010 1015 1020
 Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr
 1025 1030 1035
 Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg
 1040 1045 1050
 Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr
 1055 1060 1065
 Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser
 1070 1075 1080
 Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
 1085 1090 1095
 Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val
 1100 1105 1110
 Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp
 1115 1120 1125
 Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro
 1130 1135 1140
 Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg
 1145 1150 1155
 Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val
 1160 1165 1170
 Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr
 1175 1180 1185
 Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe
 1190 1195 1200
 Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu
 1205 1210 1215

Фиг. 7D

Gln Asp 1220	Leu Glu Val Ile 1225	Leu His Asn Gly Ala Cys 1230	Ser Pro Gly
Ala Arg 1235	Gln Gly Cys Met Lys 1240	Ser Ile Glu Val Lys 1245	His Ser Ala
Leu Ser 1250	Val Glu Leu His Ser 1255	Asp Met Glu Val Thr 1260	Val Asn Gly
Arg Leu 1265	Val Ser Val Pro Tyr 1270	Val Gly Gly Asn Met 1275	Glu Val Asn
Val Tyr 1280	Gly Ala Ile Met His 1285	Glu Val Arg Phe Asn 1290	His Leu Gly
His Ile 1295	Phe Thr Phe Thr Pro 1300	Gln Asn Asn Glu Phe 1305	Gln Leu Gln
Leu Ser 1310	Pro Lys Thr Phe Ala 1315	Ser Lys Thr Tyr Gly 1320	Leu Cys Gly
Ile Cys 1325	Asp Glu Asn Gly Ala 1330	Asn Asp Phe Met Leu 1335	Arg Asp Gly
Thr Val 1340	Thr Thr Asp Trp Lys 1345	Thr Leu Val Gln Glu 1350	Trp Thr Val
Gln Arg 1355	Pro Gly Gln Thr Cys 1360	Gln Pro Ile Leu Glu 1365	Glu Gln Cys
Leu Val 1370	Pro Asp Ser Ser His 1375	Cys Gln Val Leu Leu 1380	Leu Pro Leu
Phe Ala 1385	Glu Cys His Lys Val 1390	Leu Ala Pro Ala Thr 1395	Phe Tyr Ala
Ile Cys 1400	Gln Gln Asp Ser Cys 1405	His Gln Glu Gln Val 1410	Cys Glu Val
Ile Ala 1415	Ser Tyr Ala His Leu 1420	Cys Arg Thr Asn Gly 1425	Val Cys Val
Asp Trp 1430	Arg Thr Pro Asp Phe 1435	Cys Ala Met Ser Cys 1440	Pro Pro Ser
Leu Val 1445	Tyr Asn His Cys Glu 1450	His Gly Cys Pro Arg 1455	His Cys Asp
Gly Asn 1460	Val Ser Ser Cys Gly 1465	Asp His Pro Ser Glu 1470	Gly Cys Phe
Cys Pro 1475	Pro Asp Lys Val Met 1480	Leu Glu Gly Ser Cys 1485	Val Pro Glu
Glu Ala 1490	Cys Thr Gln Cys Ile 1495	Gly Glu Asp Gly Val 1500	Gln His Gln
Phe Leu 1505	Glu Ala Trp Val Pro 1510	Asp His Gln Pro Cys 1515	Gln Ile Cys

Фиг. 7E

047451

Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys
 1520 1525 1530
 Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg
 1535 1540 1545
 Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val
 1550 1555 1560
 Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu
 1565 1570 1575
 Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro
 1580 1585 1590
 Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser
 1595 1600 1605
 Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr
 1610 1615 1620
 Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser
 1625 1630 1635
 Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn
 1640 1645 1650
 Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys
 1655 1660 1665
 Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu
 1670 1675 1680
 Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met
 1685 1690 1695
 Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser
 1700 1705 1710
 Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys
 1715 1720 1725
 Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro
 1730 1735 1740
 Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp
 1745 1750 1755
 Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val
 1760 1765 1770
 Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln
 1775 1780 1785
 Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys
 1790 1795 1800

Фиг. 7F

Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala
1805						1810					1815			
Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met
1820						1825					1830			
Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val
1835						1840					1845			
Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro
1850						1855					1860			
Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys
1865						1870					1875			
Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly
1880						1885					1890			
Gln	Ile	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys
1895						1900					1905			
Asp	Thr	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	Trp
1910						1915					1920			
Glu	Lys	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	Cys
1925						1930					1935			
Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	Cys
1940						1945					1950			
Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu
1955						1960					1965			
Gln	Tyr	Val	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Val	Asp
1970						1975					1980			
Ile	His	Tyr	Cys	Gln	Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Met	Tyr	Ser
1985						1990					1995			
Ile	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro
2000						2005					2010			
Thr	Arg	Thr	Glu	Pro	Met	Gln	Val	Ala	Leu	His	Cys	Thr	Asn	Gly
2015						2020					2025			
Ser	Val	Val	Tyr	His	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Lys	Cys
2030						2035					2040			
Ser	Pro	Arg	Lys	Cys	Ser	Lys								
2045						2050								

Фиг. 7G



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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