

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391385** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.02.05**

(51) Int. Cl. *C07K 14/745* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*A61K 38/36* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01)  
*C07K 14/59* (2006.01)  
*A61K 38/24* (2006.01)

---

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

---

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

(32) **2012.02.14**

(33) **US**

(62) **201790960; 2013.02.05**

(71) Заявитель:

**ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:

**Фима Уди Эйял, Харт Джили (IL)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

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

**A1**

**202391385**

**202391385**

**A1**

2420-578459/022

## **ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

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

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

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

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

[004] Возможность получения на рынке FVIII и FIX обеспечила улучшение контроля опасных для жизни эпизодов кровотечения. Многие пациенты получают профилактическую терапию, которая снижает риск кровотечения и сопутствующих осложнений. Тем не менее, у значительной части пациентов (10-30%) вырабатываются ингибирующие антитела к введенным экзогенным FVIII и FIX. Введение FVIIa, который

представляет собой обходной продукт, может усиливать гомеостаз и обеспечивать эффективное лечение пациентов с ингибирующими антителами.

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

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

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

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

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

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

[010] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых

пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

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

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

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

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

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

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

[017] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающий

этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FIX.

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

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

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

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

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

[022] **Фигура 1А.** Представлена столбчатая диаграмма, показывающая собранные ограниченно разбавленные, трансфицированные и подвергнутые селекции клетки с вариантами FIX-СТР и FIX-СТР-СТР в присутствии 5 мкг/мл витамина К3. Осуществляли количественный анализ уровня FIX, применяя набор для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге

FIX-AG RUO), и рассчитанная концентрация белка (мкг/мл) представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам. На **фигуре 1В** представлены микрофотографии гелей, полученных в результате электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ЭФ в ПААГ/ДСН) и окрашивания антителом к FIX. На микрофотографии А изображено окрашивание вестерн-блота антителом к FIX; на микрофотографии В изображено окрашивание вестерн-блота антителом, узнающим гамма-карбоксилирование. На дорожку 1 в А-В загружали образец, содержащий рекомбинантный FIX, на дорожку 2 в А-В загружали образец, содержащий собранный FIX-СТР. На дорожку 3 в А-В загружали образец, содержащий собранный FIX-(СТР)<sub>2</sub>.

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

[024] **Фигура 3.** Представлена диаграмма, показывающая ФК профиль rhFIX, собранного FIX-СТР-СТР и собранного FIX-СТР.

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

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

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

[028] **Фигура 7.** Представлена диаграмма, показывающая ФК профиль очищенного FIX-СТР-СТР, rhFIX, собранного FIX-СТР-СТР и собранного FIX-СТР.

[029] **Фигура 8.** Представлено окрашивание антителом к СТР и антителом, узнающим гамма-карбоксилирование, вестерн-блотов FIX, слитого с тремя, четырьмя или пятью СТР. Собранные FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый

гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя поликлональные антитела (АТ) к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica).

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

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

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

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

поликлональные АТ к пропептиду FIX (фигура 12D) и поликлональные АТ к СТР (фигура 12E).

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

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

[036] **Фигура 15.** Представлен сравнительный ФК профиль FIX-СТР<sub>3</sub>. Осуществляли количественный анализ концентрации FIX, применяя наборы для Elisa FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени.

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

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

[039] **Фигура 18.** Представлены параметры второго теста с кровотечением. Как только первое кровотечение, описанное в подписи к фигуре 19, остановилось самопроизвольно

или было остановлено вручную, осуществляли второе тест с кровоточением через 15 минут после первого, и заново измеряли время и интенсивность кровотоечения.

[040] **Фигура 19.** Представлена схема, на которой проиллюстрирована конструкция rFVII-СТР (А), конструкция rFVII-СТР-СТР (В), конструкция rFIX-СТР (С) и конструкция rFIX-СТР-СТР (D).

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

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

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

[044] **Фигура 20D.** Представлена диаграмма, показывающая ФК профиль собранных FVII, FVII-СТР-СТР и FVII-СТР.

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

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

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

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

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

[050] **Фигура 26.** Представлен ЭФ в ПААГ/ДСН и вестерн-блоттинг конечного FVII и FVIIa. 10 мкг (партия 31) или 5 мкг (партия 38) загружали на каждую дорожку геля для ЭФ в ПААГ/ДСН, который окрашивали кумасси. 1 мкг белка загружали на каждую дорожку геля для вестерн-блоттинга. 1. Полипептид FVII-СТР<sub>3</sub>; 2. Тяжелая цепь, включающая 3х СТР; 3. Легкая цепь. Все три антитела детектировали FVII. Тяжелую цепь FVIIa детектировали антителом к СТР и легкую цепь детектировали антителами как к FVII, так и к Gl<sub>a</sub>.

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

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

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

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

[055] **Фигура 31.** Представлены иммуноблоты FVII – 3 СТР и FVII – 5 СТР. А) блоттинг GLA, В) блоттинг FVIIa, С) блоттинг СТР.

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

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

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

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

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

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

[062] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ увеличения биологического периода полужизни фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, вследствие чего продлевается биологический период полужизни фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ увеличения биологического периода полужизни фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, вследствие чего продлевается биологический период полужизни фактора свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения периода полужизни из кровообращения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения периода полужизни фактора свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения периода полужизни фактора свертывания крови.

[063] Фактор свертывания крови VII (FVII) представляет собой гликопротеин, состоящий из 444 аминокислот (50 кДа), секретируемый гепатоцитами в кровотоке в виде неактивного профермента. При повреждении ткани и при контакте с циркулирующей

кровью, FVII образует комплекс с тканевым фактором (TF), который представляет собой истинный рецепторный белок для FVII и экспрессируется различными клетками, локализованными в более глубоких слоях стенки сосуда. Образование данного комплекса FVII-TF приводит к активации FVII. Активированный FVII (FVIIa) запускает внешний путь свертывания крови путем активации фактора IX и фактора X.

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

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

[066] FIX секретируется в виде одноцепочечной молекулы, которая подвергается сложным посттранскрипционным модификациям, многие из которых необходимы для его биохимических и фармакокинетических свойств. Среди всех посттранскрипционных модификаций, 12 остатков глутаминовой кислоты около аминоконца FIX, которые гамма-карбоксилируются зависимой от витамина К гамма-карбоксилазой, являются наиболее важными. Карбоксилирование необходимо для взаимодействия FIX с фосфолипидными поверхностями и для оптимальной активности FIX. Аминоконцевой пропептид служит сайтом узнавания для гамма-карбоксилазы и, таким образом, после гамма-карбоксилирования он отщепляется сериновой протеазой аппарата Гольджи, известной как фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот

(РАСЕ/фурин). В аппарате Гольджи могут произойти четыре дополнительные посттранскрипционные модификации: сульфатация тирозина 155, фосфорилирование серина 158, О-гликозилирование по серину Ser 63 и 61 и, наконец, N-гликозилирование по аспарагину Asn 157 и 16, - но не было выявлено их необходимости для правильной активности FIX.

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

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

одного до пяти СТР к карбоксильному концу FVII или FVIIa, вследствие чего продлевается биологический период полужизни или увеличивается AUC FVII или FVIIa.

[069] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения биологического периода полужизни полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего продлевается биологический период полужизни указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ увеличения биологического периода полужизни полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего продлевается биологический период полужизни указанного полипептида FVIIa. В одном варианте реализации три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина присоединяют к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации четыре карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина присоединяют к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации пять карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина присоединяют к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[070] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего увеличивается AUC указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего увеличивается AUC указанного полипептида FVIIa. В одном варианте реализации три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина присоединяют к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации четыре карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина присоединяют к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте реализации пять карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина присоединяют к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[071] В другом варианте реализации фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой белок. В другом варианте реализации фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой пептид. В другом варианте реализации фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой полипептид. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фермент. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой сериновую протеазу. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой гликопротеин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой трансклутаминазу. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой неактивный зимоген. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой любой фактор свертывания крови, известный специалисту в данной области.

[072] В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор VIII (FVIII). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор V (FV). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор XIII (FXIII). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор X (FX). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фибрин.

[073] В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор VIIa (FVIIa). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор VII (FVII). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор IX (FIX). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор X (FX). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор XIa (FXIa). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор XII (FXII). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор Xa (FXa). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор Va (FVa). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой протромбин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой тромбин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор XI (FXI). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор фон Виллебранда (vWF). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор VIIa (FVIIa). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой FVIII с удаленным доменом B (FVIII<sub>BDD</sub>). В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет



представляет собой рекомбинантный FXa. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный FVa. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный протромбин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный тромбин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный FVIIIa. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный прекалликреин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный калликреин. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный FXIIa. В другом варианте реализации фактор свертывания крови представляет собой любой известный рекомбинантный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, содержащий сигнальный пептид, представляет собой любой известный рекомбинантный фактор свертывания крови.

[076] В другом варианте реализации фактор свертывания крови содержит 1-10 повторов СТР, присоединенных к С-концу, и не содержит СТР, присоединенных к N-концу. В другом варианте реализации фактор свертывания крови содержит по меньшей мере один СТР, присоединенный к С-концу, и не содержит СТР, присоединенных к N-концу. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, содержащий 1-10 повторов СТР, присоединенных к С-концу, и не содержащий СТР, присоединенных к N-концу, представляет собой сконструированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к С-концу, и не содержащий СТР, присоединенных к N-концу, представляет собой сконструированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, содержащий 1-10 повторов СТР, присоединенных к С-концу, и не содержащий СТР, присоединенных к N-концу, представляет собой конъюгированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к С-концу, и не содержащий СТР, присоединенных к N-концу, представляет собой конъюгированный фактор свертывания крови.

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

[078] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложен полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa),

состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

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

[080] В одном варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор VII, включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:  
 ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgcctcttgcttgggcttcagggtgcctggctgcagctctcgtaaccaggagga  
 agcccacggcgtctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttctggaggagctcggccgggctccctggagagggagtgaagg  
 aggagcagtgctccttcgaggagggccgggagatctcaaggacgcggagagacgaagctgttctggatttctacagtgatggggacc  
 agtgtgcctcaagtcgatccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccgg  
 aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtgactgcagtgaccacacgggcaccaa  
 gcgctcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcctgcacaccacagttgaatatccatgtgaaaaatacct  
 attctagaaaaaagaaatgccagcaaacccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccc aaaggggagtgccatggcaggtcct  
 gttgttgatgaatggagctcagttgtgtgggggaccctgatcaacacatctgggtggtctccgcggccactgttctgacaaaataaga  
 actggaggaacctgatcgcggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtc  
 atcatcccagcacgtacgtcccgggaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
 gtccccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgtggcctctctgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctgg  
 accgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccagactgcctgcagcagtcacggaaggtggg  
 agactccccaaatatcaggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccac  
 atgccaccactaccggggcagctggtacctgacgggcatcgtcagctggggccagggtgcgcaaccgtggggccactttggggtgtac  
 accaggtctcccagtacatcagtggtgcaaaagctcatgcgctcagagccacgcccaggagtctcctctgcagccccatttcctga  
 ggatgcgccgc (SEQ ID NO: 11).

[081] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII включает следующую последовательность аминокислот:

MVSQALRLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
 QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN  
 CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIP  
 ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWV VSAAHCFDKI  
 KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR LHQPVVLTDH  
 VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR  
 KVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
 HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 9).

[082] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора VII включает следующую последовательность аминокислот:

MVSQALRLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
 QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN  
 CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIP  
 ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWV VSAAHCFDKI  
 KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR LHQPVVLTDH  
 VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR  
 KVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
 HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP\*GCGR (SEQ ID NO: 10).

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

ctcaggacatggctctcccaggccctcaggctcctctgcttctgcttgggcttcaggctgcctggctgcagctctcgtaccaggagga  
 agcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgccaacgcgttcttgaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaagg  
 aggagcagtgctcctcaggaggcccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattcttacagtgatggggacc  
 agtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctgcctccctgcctcaggggccg  
 aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgaacgagaacggcggtgtgagcagctactgcagtgaccacacgggcaccaa  
 gcgctcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcgcacaccacagttgaatatccatgtggaaaaatacct  
 attctagaaaaaagaatgccagcaaacccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccccaaaggggagtgccatggcaggtcct  
 gttgttgatgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcgggccactgttcgacaaaatcaaga  
 actggaggaacctgatcgcgggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcggggtggcgaggtc  
 atcatcccagcacgtactcccgggaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
 gtcccctctgctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttctgctgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctgg  
 accgtggcgccacggccctggagctcatgtcctcaactgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtggg  
 agactccccaaatatcaggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggcccac  
 atgccaccactaccggggcacgtgtacc

tgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtagatcagtggtg  
cagaaactgatgagaagcagagcccagaccggcgtgctgctgagagcccccttccccagcagcagctccaaggccccctcccctagcct  
gcccagccctagcagactgcctggggccagcagacccccatcctgccccagtgaggatccgcggccgc (SEQ ID NO: 12).

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

MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRN  
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIP  
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI  
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIPSTYVPGTTNHDIALLR LHQPVVLTDH  
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSR  
KVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ  
\* (SEQ ID NO: 13).

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

ctcaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgcctctgcttggccttcagggtgcctggctgcagctcttcgtaaccaggagga  
agcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgccaacgcgttctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgaagg  
aggagcagtgctccttcaggaggcccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattcttacagtgtggggacc  
agtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctgcctcctgccttcaggggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtagctgacgtgaccacacgggcacca  
gctcctctgctggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcgcacaccacagttgaatatccatgtggaaaaatacct  
attctgaaaaaagaaatgccagcaaacccaaggccgaattgtggggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgccatggcaggtcct  
gttgttgatgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcggccactgttcgacaaaaatcaaga  
actggaggaacctgatcgcggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcggtggcgcaggtc  
atcatcccagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
gtcccctctgcctcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttctgctgcttctcattggtcagcggtggggccagctgctgg  
accgtggcgccacggccctggagctcatgtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtggg  
agactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccac  
atgccaccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtggggccacttcggcgtgtac  
accagggtgtcccagtagatcagtggtgcagaaactgatgagaagcagagcccagaccggcgtgctgctgagagcccccttccccag  
cagcagctccaaggccccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcctccgacacaccaatcctgccacagagcagct



ctccccctccatctctgccatccccagcagactgccaggccctctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccgcggccgcttaa  
ttaa (SEQ ID NO: 24).

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

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE  
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFLPAFEGRN  
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP  
ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPCGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI  
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH  
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR  
KVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG  
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ  
SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEQ ID  
NO: 25).

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

ctcaggacatggctctcccaggccctcaggctcctctgcctctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagctctcgtaaccaggagga  
agccccacggcgtcctgcaccggcgccggcgccaacgcgttctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgaagg  
aggagcagtgctccttcgaggagggccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattcttacagtgatggggacc  
agtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgctctgcctcctgcctcaggggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagctactgcagtgaccacacgggcaccaa  
gcgctcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcgcacaccacagttgaatatccatgtgaaaaatacct  
attctgaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgtccatggcaggtcct  
gttgttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcggccactgttcgacaaaataaga  
actggaggaacctgatcgggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcggtggcgagctc  
atcatcccagcacgtacgtcccggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
gtcccctctgcctcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttctgctgcttctcattggtcagcggtggggccagctgctgg  
accgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtggg  
agactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtggaggccac  
atgccaccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtggggccacttcggcgtgtac  
accagggtgtccagtagatcagtggtgcagaaactgatgagaagcgagcccagaccggcgtgctgctgagagcccccttcccag  
cagcagctccaaggccccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctggggccagtgacaccctatcctgctcagctccagctc  
cagcaaggccccaccctagcctgcttctcctctcggctgcctggccccagcgatactccaattctgccccagtcctccagcagtaagg

ctccccctccatctctgccatccccagcagactgccaggccttctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccgc (SEQ ID NO: 26).

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

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLEREC  
KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFLPAFE  
GRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTKRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPC  
GKPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWV VSAAHC  
FDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR LHQPVVL  
TDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQ  
QSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCA  
TVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTP  
LPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ\*\*G

(SEQ ID NO: 27).

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

ctcaggacatggctctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagctctcgtaaccaggagga  
agccccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcccaacgcgttctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgaagg  
aggagcagtgctccttcgaggagggccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattcttacagtgatggggacc  
agtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctgcctcctgccttcgaggccgg  
aactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagctactgcagtgaccacacgggcaccaa  
gcgctcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcgcacaccacagttgaatatccatgtggaaaaatacct  
attctgaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgccatggcaggtcct  
gttgttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcggccactgttcgacaaaaatcaaga  
actggaggaacctgatcgcggtgctggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcggtggcgagctc  
atcatcccagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgtg  
tgcccctctgcctcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttctgctgcttctcattggtcagcggtggggccagctgctgg  
accgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtggg  
agactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccac  
atgccaccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtggggccacttcggcgtgtac  
accagggtgtccagtagatcagtggtgcagaaactgatgagaagcgagcccagaccggcgtgctgctgagagcccccttcccag  
cagcagctccaaggccccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcctctgacaccctatcctgcctcagtcagctcc  
tctaaggctccaccaccttccctgcttagccctcaagactgccaggccctagcgatacacaattctgccccagctcctccagcagcaaggc

tccccacctagcctgccttctccatcaaggctgcctggcccatccgataccccaatttgcctcagagcagctctagcaaggcacctcccc  
 ccagtctgccttccaagcagactccctggccttcagacactccaatcctcccacagtctctagctctaaagetccacctcccagcctgc  
 ccagccctagtagactccccggaccttctgatacccccattgccccagtgatgaggatccgc (SEQ ID NO: 28).

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

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLEREC  
 KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFE  
 GRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPC  
 GKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHC  
 FDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRHLHQPVVL  
 TDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQ  
 QSRKVGDSPNITEYMF CAGYSDGSKDSC KGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCA  
 TVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPIL  
 LPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKA  
 PPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ\*\*GS (SEQ ID NO:  
 29).

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

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccattgccttttaggatatctactcagtctgaatgta  
 cagttttctgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcggccaaagaggataattcaggtaaattggaagagttgtcaagggaacctt  
 gagagagaatgtatggaagaaaagtgtatgtttgagaagcagcagagaagttttgaaacactgaaagaacaactgaatttggaagcagta  
 tgttgatggagatcagtgtgagccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtcccttgattt  
 gaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgtgataacaaggtggtt  
 tgctcctgactgaggatcgcacttgcaaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcaca  
 cttctaagctcaccgctgctgagactgttttctgatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaaccattttggataacatcactcaaagca  
 cccaatcattaatgacttactcgagttgttggtggagaagatgccaaccaggtaattccctggcaggtgtttgaaatggtgaaagtgat  
 gcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtgaaatgaaatgagttgtcgcaggtga  
 acataatattgaggagacagacacacagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagta  
 caaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctattgcattgctgacaaggaatacacgaa  
 catctcctcaaattggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaggagatcagctttagttctccagcttagagttc  
 cactgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattca  
 tgtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtggaaggaccagtttctaactggaattattagctgggggtgaagagtgcaat  
 gaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccgtatgtcaactggattaaggaaaaacaagctcacttgaacgcggccgc  
 (SEQ ID NO: 16).

[094] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX включает следующую последовательность аминокислот:

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYEC  
 WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP  
 FPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP  
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK  
 RNVIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSGSYVSG  
 WGRVFBHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG  
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRVYVNWIKETKLT\* (SEQ ID NO:  
 17).

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

gcgatcgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatccatctgccttttaggatatctactcagtctgaatgt  
 acagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgccaagaggtataattcaggtaaattggaagagttgttcaagggaacc  
 ttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagcagagaagttttgaaaactgaaagaacaactgaattttggaagcagt  
 atgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttggat  
 ttgaaggaaagaactgtgaattagatgaacatgaacattaagaatggcagatgagcagcagttttgaaaaatagtgctgataacaaggtgg  
 tttctcctgtactgaggatcgactgcagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcaca  
 acttctaagctcaccctgctgagactgttttctgatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaaccattttgataacatcactcaagc  
 accaatcatttaagtactcactcaggtgttggtggagaagatgccaaccaggtcaattccctggcaggtgttttgaatggtaaagttgat  
 gcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgcccactgtgtgaaactggtgtttaaattacagttgtcgcaggtga  
 acataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaatttccctcaccacaactacaatgcagctattaataagta  
 caaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaa  
 catcttctcaaatggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaaggagatcagcttagttctcagtagcttagagttcc  
 actgttgaccgagccacatgtctctgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcat  
 gtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtggaaggaccagtttctaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatg  
 aaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccgtatgtcaactggattaaggaaaaacaagctcactagctccagcagcaaggccc  
 ctccccgagcctgccctccccaaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagtgatgaaggctctggatccgcggcc  
 gc (SEQ ID NO: 18).

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

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC  
 WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP  
 FPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP  
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK  
 RNVIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSGYVSG  
 WGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG  
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYVNWIKETKLTSSSSKAPPSLPS  
 PSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 19).

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

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatccatctgccttttaggatatctactcagtctgaatgt  
 acagttttcttgatcatgaaaacgccaaacaaattctgaatcggcacaagaggtataattcaggtaaattggaagagttgtcaagggaacc  
 ttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtatgtttgaagaagcagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttggaagcagt  
 atgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttgat  
 ttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtctgataacaagggtgg  
 tttctctgtactgaggatctgacttcgagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttcctatgtggaagagtttctgtttcaca  
 acttctaagctcaccctgtgagactgttttctgatgtggactatgtaattctactgaagctgaaaccattttgataacatcactcaaac  
 accaatcatttaatgacttcactcagttgttggtggagaagatgccaaaccagggtcaattccctggcaggtgtttgaaatgtaaaagtgat  
 gcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgttaaaattacagttgtcgcaggtga  
 acataatattgaggagacagaaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagta  
 caaccatgacattgccctctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctacaaggaatacacgaac  
 atcttctcaaatttgatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaggagatcagctttagtcttctcagctaccttagagtcca  
 ctgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcatgt  
 caaggagatagtgggggaccctatgactgaagtggaagggaccagtttcttaactggaattattagctgggggtgaagagtgatgcaatgaa  
 aggcaaatatggaatatataccaaggtatcccggatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcagcaaggccct  
 cccccgagcctgccctcccaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctccttaaggccccctctcca  
 tcctgccatccccctcccggctgcctggccctctgacaccctatcctgcctcagtgatgaaggctggtatccgcccgc (SEQ ID  
 NO: 20).

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

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC

WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP  
 FPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP  
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK  
 RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIIDKEYTNIFLKFSGSYVSG  
 WGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG  
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYVNWIKKTKLTSSSSKAPPSLPS  
 PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 21).

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

tctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagt  
 gctgaatgtacagttttctgatcatgaaaacgccaaacaaatctgaatcggccaaagaggtataatcaggtaaatggaagagttgttca  
 agggaaccttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagcagagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaat  
 ggaagcagtatgtgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtg  
 cccttgattgaaagaaagaactgtgaattagatgaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgctgata  
 acaagtggttctctctgactgaggatcgcactgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccattccatgtggaagagtt  
 ctgttcacaaacttctaagctcaccctgctgaggcagttttctgatgtggactatgtaattctactgaagctgaaaccattttgataacat  
 cactcaaagcaccatcattaatgactcactcagttgttggtggagaagatgcaaaccaggtcaattccctggcaggtgtttgaaatg  
 gtaaagttgatgcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtaaaattacagttg  
 cgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaaagcgaatgtgattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagcta  
 ttaataagtaaacatgacattgccctctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacactattgacattgctgacaagga  
 atacacgaacatcttctcaatttgatctggctatgtaagtggctggggaagagctccacaaaggagatcagctttagttcttcagtagc  
 ttagagttccactgttgaccgagccacatgtctctgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggagta  
 gagattcatgtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaaagtggaaggaccagtttcttaactggaattattagctgggggtaagag  
 tgtgcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggtatcccggatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcag  
 caaggccctccccgagcctgcctccccaaagcaggctgcctgggccagtgacaccctatcctgcctcagtcagctccagcaagg  
 cccccccctagcctgccttctcttctcggtgcctggccccagcgatactccaattctgccccagtcctccagcagtaaggtccccctc  
 catctctgccatccccagcagactgccaggcccttctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccgcggccgc (SEQ ID  
 NO: 30).

[0100] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-(СТР)<sub>3</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN  
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC  
 WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP

FPCGRVSVSQTSKLTRAFAVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP  
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK  
 RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFSGYVSG  
 WGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG  
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRVYVNWIKETKLTSSSSKAPPSLPS  
 PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSD  
 TPILPQ\*\* (SEQ ID NO: 31).

[0101] В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-(СТР)<sub>4</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

tctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagt  
 gctgaatgtacagttttctgatcatgaaaacgccaaacaaatctgaatcggccaaagaggtataatcaggtaaatggaagagttgttca  
 agggaaccttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagcagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaat  
 ggaagcagtatgtgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaatcctatgaatgttggtg  
 cccttgattgaaagaaagaactgtgaattagatgaacatgaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgctgata  
 acaagtggttctcctgactgagggatcgcactgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtt  
 ctgttcacaaacttcaagctcaccctgctgaggcagttttcctgatgtggactatgtaattctactgaagctgaaaccatttggataacat  
 cactcaaagcaccatcattaatgactcactcagttgttggtggagaagatgcaaaccaggtcaattccctggcaggtgtttgaaatg  
 gtaaagttgatgcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactggtgtaaaattacagttg  
 cgcaggtgaacataataggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattatcctcaccacaactacaatgcagcta  
 ttaataagtaaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacactattgacattgctgacaagga  
 atacacgaacatctcctcaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagctccacaaaggagatcagctttagttctcagtagc  
 ttagagttccactgttgaccgagccacatgtctcagctacaaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggagga  
 gagattcatgtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaaagtggaaggaccagtttcttaactggaattattagctggggggaagag  
 tgtgcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggtatcccggatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcag  
 caaggccctccccgagcctgcctccccaaagcaggctgcctgggccctctgacacccctatctgcctcagtcagctcctcaaggcc  
 ccaccacctcctgctagccctcaagactgccaggcctagcgatacacaattctgccccagtcctccagcagcaaggctccccac  
 ctgagcctgccttctcatcaaggctgcctggccatccgatcccccaatttgcctcagagcagctctagcaaggcacctccccagctctgc  
 cctctcaagcagactcctggccctcagacactccattctgccacagtgatgaggatccggggccgc (SEQ ID NO: 32).

[0102] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-(СТР)<sub>4</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

SRVDPAMQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEE  
 FVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDI  
 NSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSC

EPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAEAVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVG  
 EDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETE  
 HTEQKRN VIRIIPHHNYNA AINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIA DKEYTNIFLKFGS  
 GYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQ  
 GDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTSSSSKA  
 PPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSR  
 LPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ\*\*GSAA (SEQ ID NO: 33).

[0103] В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фактор IX-(СТР)<sub>5</sub> (присоединенные к карбоксильному концу), включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

ctagagtcgacccccccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtg  
 ctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgcccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagttgtcaa  
 gggaaccttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaactgaaagaacaactgaatttg  
 gaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgc  
 ctttgattgaaagaaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgtgataa  
 caagtggttgctcctgtactgaggatcgcactgcagaaaaccagaagtctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagttc  
 tgttcacaaacttctaagctcaccctgctgaggcagttttctgatgtggactatgaaattctactgaagctgaaaccattttggataacatc  
 actcaagcacccaatcatttaactgactcactcagtggtgtggagaagatgccaaccaggtaattccctggcaggtgtttgaaatgg  
 taaagttgatgcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgtgaaactggtgtaaaattacagttgtc  
 gcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagctat  
 taataagtacaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgattgctgacaaggaa  
 tacacgaacatcttctcaatttgatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaaggagatcagctttagttctcagtaacct  
 tagagttccactgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggagta  
 gagattcatgtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaaatggaaggaccagtttcttaactggaattattagctgggggtgaagag  
 tgtgcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggtatcccggatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcag  
 caaggccctccccgagcctgcctccccaaagcaggctgcctggccctctgacacccctatctgcctcagtcagctcctctaaggct  
 ccaccacctcctgcctagccctcaagactgccaggccttagcgatacacaattctgccccagtcctccagcagcaaggctccccac  
 ctgacctgccttctcatcaaggctgcctggccatccgatacccaattttgcctcagagcagctctagcaaggcacctccccagctctgc  
 cctctcaagcagactcctggccctcagacactccaatcctccacagtcctctagctctaaagctccacctccagcctgccagcctca  
 gtagactccccggaccttctgatacccccatttgcctcagtagatgaggatccgcggccgc (SEQ ID NO: 34).

[0104] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фактора IX-(СТР)<sub>5</sub> (присоединенных к карбоксильному концу) включает следующую последовательность аминокислот:

RVDPAMQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEF  
 VQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDIN

SYECWCPCFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCE  
 PAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAEAVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGE  
 DAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEK WIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETE  
 TEQKRN VIRIIPHHNYNA AINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKFSG  
 YVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVD RATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQG  
 DSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGE ECAMKGKYGIYTKVSRVYVNWIK ETKLTSSSSKAPP  
 PSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPSRLP  
 GPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILP  
 Q\*\*GSAA (SEQ ID NO: 35).

[0105] В другом варианте реализации в клетку, экспрессирующую фактор свертывания крови-СТР согласно настоящему изобретению, добавляют фурин. В другом варианте реализации фурин повышает эффективность продукции в клетке фактора свертывания крови-СТР согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации фурин котрансфицируют с вектором, включающим кодирующую последовательность фактора свертывания крови-СТР согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации фурин кодируется отдельным вектором. В другом варианте реализации фурин и фактор свертывания крови-СТР кодируются одним вектором. В другом варианте реализации последовательность, кодирующую фурин, встраивают в pCI-DHFR. В другом варианте реализации последовательность, кодирующую фурин, встраивают в pCI-dhfr/smaI+NotI, Furin/AsiI F.I.+NotI.

[0106] В другом варианте реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая фурин, включает следующую последовательность нуклеиновых кислот:

tctagagtcgaccccgccatggagctgaggccctggtgctatgggtggtagcagcaacaggaacctggctctgtagcagctgatgctc  
 agggccagaaggtcttcaccaacacgtgggctgtgcatccctggaggcccagcgggtggccaacagtgtggcacggaagcatgggtt  
 cctcaacctgggagatcttcggggactattaccattctggcatcgaggagtacgaagcggctcctgtcgcctcaccgcccgggca  
 cagccggctgcagagggagcctcaagtacgtggctggaacagcaggtggcaaacgacggactaaacggggacgtgtaccaggagcc  
 cacagacccaagtctcctcagcagtggtacctgtctggtgtcactcagcgggacctgaatgtgaaggcggcctgggcgagggctaac  
 agggcacggcattgtggtctcattctggacgatggcatcgagaagaaccaccggacttggcaggcaattatgatcctggggccagttt  
 gatgtcaatgaccaggacctgacccccagcctcggtacacacagatgaatgacaacaggcacggcacacgggtgtcgggggaagtgg  
 ctgcggtggccaacaacgggtgtctgtggtgtaggtgtggcctacaacgcccgcattggaggggtgcgcatgctggatggcgaggtgaca  
 gatgcagtgaggcacgctcgtgggctgaacccaaccacatccacatctacagtccagctggggccccgaggatgacggcaaga  
 cagtgatgggcccagcccgcctcggcaggaggccttctccgtggggttagccagggccgaggggggctgggctccatcttctgtctgg  
 gcctcggggaacgggggcccgggaacatgacagctgcaactgcgacggctacaccaacagatctacacgctgtccatcagcagcgc  
 cgagtttggcaacgtgccgtgtacagcagggcctgctcgtccacactggccacgacctacagcagtggaaccagaatgagaagcag  
 atcgtgacgactgactgcggcagaagtgcacggagtctcacacgggcacctcagcctctgccccttagcagccggcatcattgctctca

ccctggaggccaataagaacctcacatggcgggacatgcaaacacctggtggtacagacctgaagccagcccacctcaatgccaacgac  
 tggccaccaatggtgtgggcccggaaagtgagccactcatatggctacgggcttttggacgcaggcgccatggtggccctggcccagaat  
 tggaccacagtggccccagcggaaagtgcacatcgcacatcctaccgagcccaaaagacatcgggaaacggctcgaggtgcggaaga  
 ccgtgaccgctgcctgggagcccaaccacatcactcggctggagcacgctcaggcgggctcacctgtcctataatgccctggc  
 gacctggccatccacctggtcagccccatgggcacccgctccacctgctggcagccaggccacatgactactccgcagatgggttaat  
 gactgggcttcatgacaactcattcctgggatgaggatccctctggcgagtgggtcctagagattgaaaacaccagcgaagccaact  
 atgggagctgaccaagttcacctcgtactctatggcaccgcccctgaggggctgcccgtacctccagaaagcagtggtgcaagacc  
 tcactcagtcaggcctgtgtggtgtgcgaggaaggcttctcctgcaccagaagagctgtgtccagcactgccctcaggcttcgccc  
 ccaagtctcgatacgactatagcaccgagaatgacgtggagaccatccgggcccagcgtctgcgccccctgccacgcctcatgtccac  
 atgccaggggcccggcctgacagactgcctcagctgccccagccacgcctcctggaccctgtggagcagactgtcccggcaagcc  
 agagcagccgagagtccccgccacagcagcagccacctcggctgccccggaggtggaggcggggcaacggctgcgggcagggt  
 gctgccctcacacctgcctgaggtggtggccggcctcagctgcgcctcatcgtgctggtcttctcactgtcttctggtcctgcagctgcg  
 ctctggctttagtttcggggggtgaaggtgtacaccatggaccgtggcctcatctcctacaaggggctgccccctgaagcctggcaggag  
 gactgcccgtctgactcagaagaggacgagggccggggcgagaggaccgctttatcaagaccagagcgcctctgaacgcggccg  
 c (SEQ ID NO: 22).

[0107] В другом варианте реализации последовательность аминокислот фурина включает следующую последовательность аминокислот:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLN  
 LGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDVYQEPT  
 DPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGA  
 SFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVA AVANNGVCGVGVAYNARIGGVRML  
 DGEVTDAVEARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAFFRQVVSQGRGGL  
 GSIFVWASGNGGREHDSNCNDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGN  
 QNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIALTLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPA  
 HLNANDWATNGVGRKVSHSYGYLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDI  
 GKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGD LAIHLVSPMGTRSTLLAARP  
 HDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAPEGL  
 PVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRA  
 SVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQPPRLPPEV  
 EAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVK VYTMDRGLIS  
 YKGLPPEAWQEECPDSEEDGREGERTAFIKDQSAL\* (SEQ ID NO: 23).

[0108] В одном варианте реализации термин фактор свертывания крови дополнительно включает гомолог известного фактора свертывания крови. В одном варианте реализации гомолог обладает коагулирующей активностью. В некоторых вариантах реализации, в объем термина «гомология» согласно настоящему изобретению также входят варианты с

делецией, вставкой или заменой, включая замену аминокислоты, и биологически активные фрагменты полипептида. В одном варианте реализации вариант включает консервативные замены, или делеции, вставки, или замены, которые значительно не изменяют трехмерную структуру фактора свертывания крови. В другом варианте реализации делеция, вставка или замена не изменяет исследуемую функцию фактора свертывания крови, который, в одном варианте реализации связывается с определенным партнером по связыванию.

[0109] В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомолог фактора свертывания крови. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомолог фактора свертывания крови, обладающий коагулирующей активностью. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомолог фактора свертывания крови, осуществляющий функциональное связывание. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте, обладающие коагулирующей активностью. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте, осуществляющие функциональное связывание. В другом варианте реализации гомологи представляют собой, например, полипептиды, которые на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичны фактору свертывания крови, что определяют с применением программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI), применяя параметры по умолчанию.

[0110] В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фурина. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает гомологи фурина, у которых сохранилась интересующая функция, которая в одном варианте реализации представляет собой расщепление белка-предшественника. В другом варианте реализации гомологи представляют собой, например, полипептиды, которые на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологичны фурину, что определяют с

применением программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI), применяя параметры по умолчанию.

[0111] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от одного до трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР на карбоксильном конце.

[0112] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

[0113] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и от одного до пяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

[0114] Должно быть очевидно, что композиции и способы согласно настоящему изобретению, включающие компоненты или этапы, описанные в настоящем тексте, могут, в другом варианте реализации состоять из тех же компонентов или этапов или, в другом варианте реализации состоять по существу из тех же компонентов или этапов. В некоторых вариантах реализации, термин “включать” относится к включению указанного активного агента, такого как СТР-модифицированный фактор свертывания крови, а также к включению других активных агентов, и фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, смягчительных средств, стабилизаторов и т.д., известных в фармацевтической промышленности. В некоторых вариантах реализации, термин “состоящий по существу из” относится к композиции, в которой единственный активный ингредиент представляет собой указанный активный ингредиент, тем не менее, могут быть включены также другие соединения, которые нужны для стабилизации, консервирования и т.д. лекарственной формы, но непосредственно не участвуют в терапевтическом действии указанного активного ингредиента. В некоторых вариантах

реализации, термин “состоящий по существу из” может относиться к компонентам, которые способствуют высвобождению активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации, термин “состоящий” относится к композиции, которая содержит активный ингредиент и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0115] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и два карбоксиконцевых пептида (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до трех СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до четырех СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до пяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до шести СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до семи СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до восьми СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до девяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от двух до десяти СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови.

[0116] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от трех до четырех СТР, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий фактор свертывания крови и от













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

[0127] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, на аминоконце которого нет СТР. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, у которого отсутствует СТР на аминоконце. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, содержащего по меньшей мере один СТР на карбоксильном конце и не содержащего СТР на аминоконце. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен полипептид, включающий, состоящий по существу из или состоящий из фактора свертывания крови, содержащего несколько СТР на карбоксильном конце, описанного в настоящем тексте, и не содержащего СТР на аминоконце.

[0128] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, описанный выше в настоящем тексте.

[0129] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX.

[0130] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложен полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0131] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный фактор свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен сконструированный фактор свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте, называют СТР-модифицированным фактором свертывания крови.

[0132] В одном варианте реализации СТР, которые присоединяют к карбоксильному концу фактора свертывания крови, присоединены к карбоксильному концу последовательно.

[0133] В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентной или улучшенной биологической активностью по сравнению с не модифицированным СТР фактором свертывания крови. В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентными или улучшенными фармакологическими показателями, по сравнению с не модифицированным СТР фактором свертывания крови. В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентной или улучшенной фармакокинетикой, по сравнению с не модифицированным СТР фактором свертывания крови. В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обладает эквивалентной или улучшенной фармакодинамикой, по сравнению с немодифицированным СТР фактором свертывания крови.

[0134] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения и лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора VII согласно настоящему изобретению.

[0135] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора IX согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации гемофилия представляет собой гемофилию В. В одном варианте реализации гемофилия В известна как недостаточность фактора IX или болезнь Кристмаса. В одном варианте реализации гемофилия представляет собой тяжелую гемофилию, которая, в одном варианте реализации описана как гемофилия, при которой уровни факторов свертывания крови составляют 0-1%. В другом варианте реализации гемофилия представляет собой умеренную гемофилию, которая, в одном варианте реализации описана как гемофилия,

при которой уровни факторов свертывания крови составляют 1-5%. В другом варианте реализации гемофилия представляет собой легкую гемофилию, которая, в одном варианте реализации описана как гемофилия, при которой уровни факторов свертывания крови составляют 5-50%.

[0136] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающего полипептид FIX и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, , что обеспечивает предотвращение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора VII (FVII), включающего полипептид FVII и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVII, , что обеспечивает предотвращение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта.

[0137] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающего полипептид FIX и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0138] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту одного или более СТР-модифицированных факторов свертывания крови, описанных в настоящем тексте. Таким образом, в одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение

указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающего полипептид FIX и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, и полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В одном варианте реализации СТР-модифицированный FIX и СТР-модифицированный FVIIa вводят в составе одной и той же композиции в одно и то же время. В другом варианте реализации СТР-модифицированный FIX и СТР-модифицированный FVIIa вводят в отдельных композициях в одно и то же время. В другом варианте реализации СТР-модифицированный FIX и СТР-модифицированный FVIIa вводят в отдельных композициях в разные моменты времени.

[0139] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и четыре карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и пять карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ

предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) и СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX и FVII и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX и указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) и СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX и FVII и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX и указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0140] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и четыре карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ

предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и пять карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) или СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX или FVII и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX или указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) и СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX и FVII и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX и указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX) и СТР-модифицированного фактора VII, включающего полипептид FIX и FVII и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу полипептида указанного FIX и указанного FVII, что обеспечивает предотвращение или лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0141] В некоторых вариантах реализации, в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, указанный способ включает этап введения субъекту СТР-модифицированного фактора свертывания крови, содержащего от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида фактора свертывания крови, при этом последовательность указанного СТР-модифицированного фактора

свертывания крови выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 27 или 29, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта.

[0142] В некоторых вариантах реализации, в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения гемофилии у субъекта, указанный способ включает этап подкожного введения субъекту СТР-модифицированного фактора VII, включающего от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVII, при этом последовательность указанного СТР-модифицированного FVII выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 27 или 29, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта.

[0143] В других вариантах реализации, сконструированный фактор свертывания крови предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В одном варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 3 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В другом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 4 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В третьем варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 5 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В четвертом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 2 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В пятом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 1 СТР, присоединенный к его карбоксильному концу, предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. В других вариантах реализации, сконструированный фактор свертывания крови может уменьшить количество инфузий, необходимых для пациента, уменьшить необходимые для пациента дозы, или уменьшить и то, и другое.

[0144] В одном варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 3 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, проявляет улучшенный ФК профиль, при этом сохраняется его коагулирующая активность по сравнению с собранным FIX-СТР-СТР, собранным FIX-СТР или ghFIX. В одном варианте реализации период полужизни rFIX-СТР3 от 2,5 до 4 раз больший, чем таковой для rFIX у крыс и у мышей, лишенных FIX. В другом варианте реализации введение rFIX-СТР3 значительно продлевает прокоагулирующий эффект у мышей, лишенных FIX, на по меньшей мере 76 ч. после введения. В третьем варианте реализации введение rFIX-СТР3 вызывает более высокий пик активности, чем у rFIX у мышей, лишенных FIX. В четвертом варианте

реализации фактор свертывания крови IX, включающий 2 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, проявляет улучшенный ФК профиль, при этом сохраняется его коагулирующая активность по сравнению с собранным FIX-СТР или rhFIX. В другом варианте реализации фактор свертывания крови IX, включающий 2 СТР, последовательно присоединенных к его карбоксильному концу, обладает в 3 раза большим периодом полужизни и в 4,5 раза большей AUC по сравнению с rhFIX.

[0145] В другом варианте реализации п/к введение приводит к большей биодоступности СТР-модифицированного FVII по сравнению с рекомбинантным FVII. В другом варианте реализации период полужизни увеличивается и биодоступность (AUC п/к/AUC в/в) повышается после п/к введения FVIIa-СТР 3 и 5, по сравнению с п/к введением NovoSeven®. В другом варианте реализации инъецированный подкожно MOD-5014 и MOD-5019 показал улучшенную выживаемость мышей, по сравнению с рекомбинантным FVII (NovoSeven®) (см. пример 8, ниже).

[0146] В другом варианте реализации термины “СТР-пептид”, “карбоксиконцевой пептид” и “последовательность СТР” используют взаимозаменяемо в настоящем тексте. В другом варианте реализации карбоксиконцевой пептид представляет собой полноразмерный СТР. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

[0147] В другом варианте реализации к N-концу СТР присоединен сигнальный пептид, как описано в US 7553940, который полностью включен в данную заявку посредством ссылки.

[0148] В других вариантах реализации, термин “сконструированный фактор свертывания крови” относится к последовательности аминокислот созревшего фактора свертывания крови. В других вариантах реализации, термин “сконструированный фактор свертывания крови” относится к последовательности аминокислот фактора свертывания крови, включающей сигнальную последовательность или сигнальный пептид.

[0149] В другом варианте реализации термины “сигнальная последовательность” и “сигнальный пептид” используют взаимозаменяемо в настоящем тексте. В другом варианте реализации термин “последовательность”, при описании полинуклеотидной молекулы, может относиться к кодирующей части. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

[0150] В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, описанный в настоящем тексте, обладает повышенной биологической активностью *in vivo*, по сравнению с тем же фактором свертывания крови без по меньшей мере одного СТР. В одном варианте реализации

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

[0151] В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышенную защиту от деградации фактора свертывания крови. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышенную защиту от клиренса. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает увеличенное время клиренса. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови увеличивает  $C_{\max}$ . В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови увеличивает  $T_{\max}$ . В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови увеличивает время полужизни ( $T_{1/2}$ ).

[0152] В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют таким же способом, что и немодифицированный конъюгированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению обладает большим периодом полужизни из кровообращения и временем удерживания в плазме, пониженным клиренсом и повышенной клинической активностью *in vivo*. В другом варианте реализации благодаря улучшенным свойствам конъюгированного фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте, данный конъюгат вводят с меньшей частотой, чем немодифицированную форму того же фактора свертывания крови.

[0153] В другом варианте реализации уменьшение частоты введения приведет к улучшенной стратегии лечения, которая, в одном варианте реализации приведет к улучшению исполнительности пациента, что приведет к улучшению результатов лечения, а также к улучшению качества жизни пациента. В другом варианте реализации по

сравнению с обычными конъюгатами факторов свертывания крови, было обнаружено, что конъюгаты, обладающие молекулярной массой и структурой линкера, как у конъюгатов согласно настоящему изобретению, обладают повышенной эффективностью, повышенной стабильностью, повышенными уровнями AUC и увеличенным периодом полужизни из кровообращения.

[0154] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора IX (FIX), состоящий из полипептида FIX и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного СТР-модифицированного полипептида FIX.

[0155] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

[0156] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложена композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови, описанного в настоящем тексте. В одном варианте реализации терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови определяют в соответствии с такими факторами, как конкретное состояние, от которого лечат, общее состояние пациента, которого лечат, а также другие ингредиенты в указанной композиции.

[0157] В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для профилактического лечения гемофилии, таким образом снижая риск кровотечения и сопутствующих осложнений. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии, при этом снижая риск выработки ингибирующих антител на экзогенно введенные факторы свертывания крови. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания

крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии, таким образом стимулируя гомеостаз.

[0158] В одном варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют в терапевтических целях. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют в профилактических целях.

[0159] В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, подверженных избыточному кровотечению или ушибам, или имеющих пролонгированное протромбиновое время (ПТВ) или частичное тромбопластиновое время (ЧТВ). В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, имеющих приобретенное состояние, которое вызывает кровотечение, такое как дефицит витамина К или заболевание печени. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, имеющих недостаточность факторов свертывания крови, которая является приобретенной (в результате других заболеваний) или наследственной, легкой или тяжелой, постоянной или временной. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии А. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от гемофилии В. В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, имеющих приобретенную недостаточность вследствие хронических заболеваний, таких как заболевание печени или рак; вследствие острого состояния, такого как диссеминированная внутрисосудистая коагуляция крови (ДВК), при которой с большой скоростью расходуются факторы свертывания крови; или вследствие дефицита витамина К или лечения антагонистом витамина К, таким как варфарин (для продукции факторов II, VII, IX и X требуется витамин К). В другом варианте реализации конъюгированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, полезен для лечения субъектов, страдающих от заболевания, которое вызывает дисбаланс свертывания крови, такого как, но не ограничиваясь перечисленными: заболевание печени, уремия, рак, нарушение костного мозга, воздействие змеиного яда, дефицит витамина К, антикоагуляционная терапия, случайный прием внутрь антикоагулянта варфарина, множественные переливания крови (единицы крови при хранении теряют некоторое количество факторов свертывания крови) или комбинация перечисленных. В

другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения тромбоза глубоких вен у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения неконтролируемого кровотечения у субъекта с гемофилией, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения эпизодов кровотечения у субъекта с гемофилией, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ контролирования эпизодов кровотечения у субъекта с гемофилией В (врожденным дефицитом фактора IX).

[0160] В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению предназначены для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией А или В с помощью ингибиторов FVIII или FIX и у пациентов с приобретенной гемофилией; предотвращения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных процедурах у пациентов с гемофилией А или В с помощью ингибиторов FVIII или FIX и у пациентов с приобретенной гемофилией; лечения эпизодов кровотечения у пациентов с врожденной недостаточностью FVII и предотвращения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных процедурах у пациентов с врожденной недостаточностью FVII. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению предназначены для лечения или предотвращения мышечных кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению предназначены для лечения или предотвращения суставных кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение носового кровотечения и кровоточивости десен, кровотечения из слизистой оболочки, кровотечения в пределах центральной нервной системы. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение кровотечения желудочно-кишечного тракта или мозгового кровотечения. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редких легких кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редких умеренных кровотечений. В

другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение частых легких кровотечений. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение частых умеренных кровотечений.

[0161] В одном варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение бессимптомной гемофилии. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение легкой – умеренной гемофилии. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение тяжелой гемофилии.

[0162] В одном варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение кровоизлияния, которое представляет собой, в одном варианте реализации некупируемое кровотечение и, в другом варианте реализации внутримозговое кровоизлияние. В другом варианте реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению применяют для терапевтического или профилактического лечения коагулопатии новорожденных; тяжелого заболевания печени; для хирургических процедур с высокой степенью риска; травматической потери крови; для трансплантации костного мозга; тромбоцитопений и нарушения функции тромбоцитов; для неотложного ингибирования действия пероральных антикоагулянтов; врожденных дефицитов факторов V, VII, X и XI; или болезни фон Виллебранда, в одном варианте реализации для терапевтического или профилактического лечения болезни фон Виллебранда с помощью ингибиторов фактора фон Виллебранда.

[0163] В одном варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют для лечения у субъекта гемофилии или сопутствующего заболевания, описанного в настоящем тексте. В одном варианте реализации субъект представляет собой человека. В другом варианте реализации субъект представляет собой одомашненное животное. В другом варианте реализации субъект представляет собой млекопитающее. В другом варианте реализации субъект представляет собой сельскохозяйственное животное. В другом варианте реализации субъект представляет собой обезьяну. В другом варианте реализации субъект представляет собой лошадь. В другом варианте реализации субъект представляет собой корову. В другом варианте реализации субъект представляет собой мышь. В другом варианте реализации

субъект представляет собой крысу. В другом варианте реализации субъект представляет собой животное из семейства псовых. В другом варианте реализации субъект представляет собой животное из семейства кошачьих. В другом варианте реализации субъект представляет собой животное из семейства бычьих, овечьих, свиных, лошадиных, мышинных или оленьих. В одном варианте реализации субъект представляет собой мужчину. В другом варианте реализации субъект представляет собой женщину. В одном варианте реализации субъект представляет собой ребенка, в другом варианте реализации подростка, в другом варианте реализации взрослого или, в другом варианте реализации пожилого субъекта. В другом варианте реализации субъект представляет собой пациента детского возраста, в другом варианте реализации пациента старческого возраста.

[0164] В другом варианте реализации «(СТР)<sub>n>1</sub>-фактор свертывания крови», описанный в настоящем тексте, включает полноразмерный фактор свертывания крови или его активный фрагмент, соединенный посредством пептидной связи на карбоксильном конце с по меньшей мере одной молекулой СТР, при этом на его аминоконце отсутствуют СТР. В другом варианте реализации «(СТР)<sub>n>1</sub>-фактор свертывания крови», описанный в настоящем тексте, включает фактор свертывания крови или его активный фрагмент, соединенный посредством пептидной связи с по меньшей мере одной молекулой СТР, которая соединена с дополнительной молекулой СТР посредством пептидной связи, при этом на его аминоконце отсутствуют СТР. В другом варианте реализации одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует сконструированный фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к его С-концу, и не содержащий СТР на аминоконце.

[0165] В другом варианте реализации СТР присоединен к фактору свертывания крови посредством линкера. В другом варианте реализации линкер, который соединяет последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой ковалентную связь. В другом варианте реализации линкер, который соединяет последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой пептидную связь. В другом варианте реализации линкер, который соединяет последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой замещенную пептидную связь. В другом варианте реализации последовательность СТР включает: DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 1). В другом варианте реализации последовательность СТР включает: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2). В другом варианте реализации последовательность СТР включает последовательность аминокислот, выбранную из последовательностей, описанных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

[0166] В другом варианте реализации карбоксиконцевой пептид (СТР) согласно настоящему изобретению включает последовательность аминокислот хорионического гонадотропина человека от положения аминокислоты 112 до положения 145, описанную в последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает последовательность аминокислот хорионического гонадотропина человека от положения аминокислоты 118 до положения 145, описанную в последовательности SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации последовательность СТР также начинается от любого положения между положениями 112-118 и заканчивается в положении 145 последовательности аминокислот хорионического гонадотропина человека. В некоторых вариантах реализации, последовательность пептида СТР имеет длину 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислоты и начинается от положения 112, 113, 114, 115, 116, 117 или 118 последовательности аминокислот СТР.

[0167] В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 1-5 консервативных замен аминокислот, как описано в патенте США номер 5712122, который включен в данную заявку посредством ссылки. В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 1 консервативную замену аминокислоты. В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 2 консервативные замены аминокислот. В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 3 консервативные замены аминокислот. В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 4 консервативные замены аминокислот. В другом варианте реализации пептид СТР представляет собой вариант хорионического гонадотропина СТР, который отличается от нативного СТР на 5 консервативных замен аминокислот.

[0168] В другом варианте реализации последовательность аминокислот пептида СТР согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична нативной последовательности аминокислот СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте реализации последовательность аминокислот пептида СТР согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична нативной последовательности аминокислот СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте реализации последовательность аминокислот пептида СТР согласно настоящему изобретению по

меньшей мере на 90% гомологична нативной последовательности аминокислот СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте реализации последовательность аминокислот пептида СТР согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична нативной последовательности аминокислот СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте реализации последовательность аминокислот пептида СТР согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 98% гомологична нативной последовательности аминокислот СТР или соответствующему пептиду.

[0169] В другом варианте реализации полинуклеотид, кодирующий пептид СТР согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 70% гомологичен нативной последовательности ДНК СТР человека или соответствующего пептида. В другом варианте реализации полинуклеотид, кодирующий пептид СТР согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 80% гомологичен нативной последовательности ДНК СТР человека или соответствующего пептида. В другом варианте реализации полинуклеотид, кодирующий пептид СТР согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 90% гомологичен нативной последовательности ДНК СТР или соответствующего пептида. В другом варианте реализации полинуклеотид, кодирующий пептид СТР согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 95% гомологичен нативной последовательности ДНК СТР или соответствующего пептида. В другом варианте реализации полинуклеотид, кодирующий пептид СТР согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 98% гомологичен нативной последовательности ДНК СТР или соответствующего пептида.

[0170] В одном варианте реализации по меньшей мере одна из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочена. В другом варианте реализации обе последовательности аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В другом варианте реализации 2 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В другом варианте реализации 3 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В другом варианте реализации 4 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В другом варианте реализации 5 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В другом варианте реализации 2 или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В другом варианте реализации все последовательности аминокислот СТР хорионического гонадотропина укорочены. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 10 аминокислот последовательности SEQ

ID NO: 3. В другом варианте реализации SEQ ID NO: 3 включает следующую последовательность аминокислот (АК): SSSSKAPPPSLP.

[0171] В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 10 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4. В другом варианте реализации SEQ ID NO: 4 включает следующую последовательность аминокислот (АК): SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ.

[0172] В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 11 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 12 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 8 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 3. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 13 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 14 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 6 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 3. В одном варианте реализации укороченный СТР включает первые 5 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 3.

[0173] В одном варианте реализации по меньшей мере одна из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилирована. В другом варианте реализации обе последовательности аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 2 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 3 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 4 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 5 из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации 2 или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте реализации все последовательности аминокислот СТР хорионического гонадотропина гликозилированы.

[0174] В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере один сайт гликозилирования. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает 2 сайта гликозилирования. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает 3 сайта гликозилирования. В одном варианте реализации последовательность СТР согласно настоящему изобретению включает 4 сайта

гликозилирования. В одном варианте реализации одна или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина полностью гликозилирована. В другом варианте реализации одна или более из последовательностей аминокислот СТР хорионического гонадотропина частично гликозилирована. В одном варианте реализации частичное гликозилирование означает, что один из сайтов гликозилирования СТР гликозилирован. В другом варианте реализации два из сайтов гликозилирования СТР гликозилированы. В другом варианте реализации три из сайтов гликозилирования СТР гликозилированы.

[0175] В некоторых вариантах реализации, модификация последовательности СТР обеспечивает преимущество, позволяя применять меньшие дозировки. В некоторых вариантах реализации, модификация последовательностей СТР обеспечивает преимущество, позволяя применять меньшее количество дозировок. В некоторых вариантах реализации, модификация последовательностей СТР обеспечивает преимущество, позволяя оказывать безопасное, пролонгированное действие.

[0176] В некоторых вариантах реализации, в настоящем тексте в объем термина "полипептид", "сконструированный фактор свертывания крови" или "белок" входят нативные полипептиды (либо продукты деградации, либо искусственно синтезированные полипептиды, либо рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (обычно, искусственно синтезированные полипептиды), а также пептоиды и полупептоиды, которые представляют собой аналоги полипептидов, которые, в некоторых вариантах реализации, содержат модификации, которые делают полипептиды, включающие фактор свертывания крови, еще более стабильными при нахождении в организме или способными лучше проникать в клетки.

[0177] В некоторых вариантах реализации, модификации включают, но не ограничены перечисленными, модификацию С-конца, модификацию полипептидной связи, включая, но не ограничиваясь перечисленными:  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S=O}$ ,  $\text{O=C-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{S=C-NH}$ ,  $\text{CH=CH}$  или  $\text{CF=CH}$ , модификации остова и модификацию остатков. Способы получения пептидомиметических соединений хорошо известны в данной области и подробно описаны, например, в *Quantitative Drug Design*, С.А. Ramsden Gd., глава 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), которая включена посредством ссылки, как если бы она была полностью описана в настоящем тексте. Дополнительные подробности в этом отношении описаны ниже в настоящем тексте.

[0178] В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи (-CO-NH-) внутри полипептида содержат заместители. В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены N-метилованными связями (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-). В некоторых вариантах

реализации, полипептидные связи замещены сложноэфирными связями (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены кетометиленовыми связями (-CO-CH<sub>2</sub>-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены альфа-азо-связями (-NH-N(R)-CO-), где R представляет собой любой алкил, например, метил, карбо-связями (-CH<sub>2</sub>-NH-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены гидроксипропиленовыми связями (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены тиоамидными связями (-CS-NH-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены этиленовыми двойными связями (-CH=CH-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены ретроамидными связями (-NH-CO-). В некоторых вариантах реализации, полипептидные связи замещены производными полипептида (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), где R представляет собой "нормальную" боковую цепь, естественно присутствующую у атома углерода. В некоторых вариантах реализации, данные модификации могут быть осуществлены по любым связям вдоль пептидной цепи и, в одном варианте реализации по нескольким (2-3 связям) одновременно.

[0179] В некоторых вариантах реализации, природные ароматические аминокислоты полипептида, такие как Trp, Tyr и Phe, замещены на синтетические неприродные кислоты, такие как фенилглицин, TIS, нафтилеланин (Nol), метилированные по кольцу производные Phe, галогенированные производные Phe или о-метил-Tyr. В некоторых вариантах реализации, полипептиды согласно настоящему изобретению включают одну или более модифицированных аминокислот или один или более не относящихся к аминокислотам мономеров (например, жирную кислоту, сложные углеводы, и т.д.).

[0180] В одном варианте реализации предполагают, что термин "аминокислота" или "последовательность аминокислот" включает 20 встречающихся в природе аминокислот; такие аминокислоты часто оказываются посттрансляционно модифицированными *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; и другие необычные аминокислоты включают, но не ограничены перечисленными: 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин. В одном варианте реализации "аминокислота" включает как D-, так и L-аминокислоты.

[0181] В некоторых вариантах реализации, полипептиды согласно настоящему изобретению применяют для получения лекарственного средства, в котором полипептиды, включающие фактор свертывания крови, должны находиться в растворимой форме. В некоторых вариантах реализации, полипептиды согласно настоящему изобретению включают одну или более неприродных или природных полярных аминокислот, включая, но не ограничиваясь перечисленными, серин и треонин,

которые способны повышать растворимость полипептида благодаря их боковым цепям, содержащим гидроксил.

[0182] В некоторых вариантах реализации, сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют в линейной форме, хотя для специалиста в данной области должно быть очевидно, что в случаях, когда циклизация сильно не препятствует свойствам сконструированных факторов свертывания крови, также можно применять циклические формы сконструированных факторов свертывания крови.

[0183] В некоторых вариантах реализации, сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению синтезируют биохимическим способом, например, применяя стандартные твердофазные методики. В некоторых вариантах реализации, данные биохимические способы включают исключительно твердофазный синтез, частично твердофазный синтез, конденсацию фрагментов или классический синтез в растворе.

[0184] В некоторых вариантах реализации, методики рекомбинантного белка применяют для получения сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, методики рекомбинантного белка применяют для получения относительно длинных полипептидов (например, состоящих из более чем 18-25 аминокислот). В некоторых вариантах реализации, методики рекомбинантного белка применяют для получения больших количеств сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, рекомбинантные методики описаны у Bitter и др., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier и др. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson и др. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu и др. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi и др. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 и Brogli и др., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley и др. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 и Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, раздел VIII, стр. 421-463, которые полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

[0185] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена полинуклеотидная молекула, включающая кодирующую часть гена, кодирующего полипептид, включающий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена полинуклеотидная молекула, состоящая из кодирующей части гена, кодирующего полипептид, включающий фактор свертывания

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

[0186] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий по существу из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, описанный выше в настоящем тексте. В одном варианте реализации полинуклеотид представляет собой полинуклеотидную последовательность. В одном варианте реализации полинуклеотид представляет собой полинуклеотидную молекулу.

[0187] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотидную молекулу, описанную в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0188] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая

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

[0189] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, описанный в настоящем тексте. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0190] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая клетку, описанную в настоящем тексте. В другом варианте реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. В другом варианте реализации клетка представляет собой прокариотическую клетку.

[0191] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, что позволяет получить СТР-модифицированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти полинуклеотидных последовательностей, кодирующих карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, к карбоксильному концу полинуклеотидной последовательности, кодирующей указанный фактор свертывания крови, что позволяет получить СТР-модифицированный фактор свертывания крови. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению

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

[0192] В другом варианте реализации сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению синтезируют, применяя полинуклеотидную молекулу, кодирующую полипептид согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, полинуклеотидную молекулу, кодирующую сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению, лигируют в вектор экспрессии, включающий транскрипционный контроль с помощью цис-регуляторной последовательности (например, промоторной последовательности). В некоторых вариантах реализации, цис-регуляторная последовательность подходит для контролирования конститутивной экспрессии сконструированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, цис-регуляторная последовательность подходит для контролирования тканеспецифичной экспрессии сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, цис-регуляторная последовательность подходит для контролирования индуцируемой экспрессии сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению.

[0193] В некотором варианте реализации тканеспецифичные промоторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают последовательности, которые функционируют в одной или более конкретных популяциях клеток. Примеры включают, но не ограничены перечисленными, такие промоторы, как промотор альбумина, который специфичен для печени (Pinkert и др., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), специфичные для лимфоидных клеток промоторы (Calame и др., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275); в частности, промоторы Т-клеточных рецепторов (Winoto и др., (1989) *EMBO J.* 8:729-733) и промоторы иммуноглобулинов (Banerji и др. (1983) *Cell* 33729-740), специфичные для нервных клеток промоторы, такие как промотор нейрофиламента (Burgin и др. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), специфичные для поджелудочной железы промоторы (Edlunch и др. (1985) *Science* 230:912-916) или специфичные для молочной железы

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

[0194] В одном варианте реализации формулировка " полинуклеотидная молекула" относится к одно- или двунитевой последовательности нуклеиновых кислот, которую выделяют и предоставляют в виде последовательности РНК, комплементарной полинуклеотидной последовательности (кДНК), геномной полинуклеотидной последовательности и/или комбинированных полинуклеотидных последовательностей (например, комбинации описанных выше последовательностей).

[0195] В одном варианте реализации "комплементарная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которую получают путем обратной транскрипции матричной РНК, применяя обратную транскриптазу или любую другую РНК-зависимую ДНК полимеразу. В одном варианте реализации последовательность можно впоследствии амплифицировать *in vivo* или *in vitro*, применяя ДНК-полимеразу.

[0196] В одном варианте реализации "геномная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, полученной (выделенной) из хромосомы и, таким образом, она представляет собой непрерывный участок хромосомы.

[0197] В одном варианте реализации "комбинированная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая является по меньшей мере частично комплементарной и по меньшей мере частично геномной. В одном варианте реализации комбинированная последовательность может включать некоторые экзонные последовательности, необходимые для кодирования полипептида согласно настоящему изобретению, а также некоторые интронные последовательности, вставленные между ними. В одном варианте реализации интронные последовательности могут быть получены из любого источника, включая другие гены, и, как правило, будут включать консервативные сигнальные последовательности сплайсинга. В одном варианте реализации интронные последовательности включают действующие в *цис*-положении регуляторные компоненты экспрессии.

[0198] В одном варианте реализации после экспрессии и секреции, сигнальные пептиды отщепляются от сконструированных предшественников факторов свертывания крови, в результате чего получают зрелые сконструированные факторы свертывания крови.

[0199] В некоторых вариантах реализации, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению получают, применяя методики ПЦР, или любой другой способ или

процедуру, известную специалисту в данной области. В некоторых вариантах реализации, процедура включает лигирование двух различных последовательностей ДНК (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", ред. Ausubel и др., John Wiley & Sons, 1992).

[0200] В одном варианте реализации полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, которые кодируют сконструированные факторы свертывания крови, встроены в векторы экспрессии (т.е., конструкции нуклеиновых кислот), чтобы позволить экспрессию рекомбинантного полипептида. В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает дополнительные последовательности, которые делают данный вектор подходящим для репликации и встраивания в прокариотов. В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает дополнительные последовательности, которые делают данный вектор подходящим для репликации и встраивания в эукариотов. В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает челночный вектор, который делает данный вектор подходящим для репликации и встраивания как в прокариотов, так и в эукариотов. В некоторых вариантах реализации, векторы для клонирования включают последовательности инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

[0201] В одном варианте реализации множество прокариотических или эукариотических клеток можно применять в качестве хозяев для систем экспрессии для экспрессии факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, данные хозяева включают, но не ограничены перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным вектором экспрессии ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, включающими кодирующую полипептид последовательность; дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, включающими кодирующую полипептид последовательность; системы клеток растения, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии, такими как плазида T<sub>i</sub>, включающими кодирующую полипептид последовательность.

[0202] В некоторых вариантах реализации, для экспрессии факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют небактериальные системы экспрессии (например, системы экспрессии млекопитающих, такие как клетки CHO). В одном

варианте реализации вектор экспрессии, который применяют для экспрессии полинуклеотидов согласно настоящему изобретению в клетках млекопитающих, представляет собой вектор pCI-DHFR, включающий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину. Конструирование вектора pCI-dhfr описано, согласно одному варианту реализации, в примере 1.

[0203] В некоторых вариантах реализации, в бактериальных системах согласно настоящему изобретению, можно успешно выбрать множество векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого полипептида. В одном варианте реализации желательны получить большие количества полипептида. В одном варианте реализации желательны векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней белкового продукта, возможно соединенного с гидрофобной сигнальной последовательностью, которая направляет экспрессированный продукт в периплазму бактерий или культуральную среду, из которой белковый продукт легко очистить. В одном варианте реализации некоторые слитые белки сконструированы таким образом, что они содержат специфичный сайт расщепления, чтобы облегчить получение полипептида. В одном варианте реализации векторы, поддающиеся такой манипуляции, включают, но не ограничены перечисленными, векторы экспрессии в *E. coli* серии pET (Studier и др., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)).

[0204] В одном варианте реализации применяют дрожжевые системы экспрессии. В одном варианте реализации множество векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, можно применять в дрожжах, как описано в заявке на патент США номер 5932447, которая полностью включена в данную заявку посредством ссылки. В другом варианте реализации применяют векторы, которые способствуют встраиванию чужеродных последовательностей ДНК в дрожжевую хромосому.

[0205] В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые позволяют, например, транслировать несколько белков с одной мРНК, такие как участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и последовательности для встраивания в геном полипептида с химерным промотором.

[0206] В некоторых вариантах реализации, векторы экспрессии млекопитающих включают, но не ограничены перечисленными, pCDNA3, pCDNA3,1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3,1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, которые доступны для приобретения у Invitrogen, pCI, который доступен для приобретения у Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV и

pBK-CMV, которые доступны для приобретения у Strategene, pTRES, который доступен для приобретения у Clontech, и их производные.

[0207] В некоторых вариантах реализации, в настоящем изобретении применяют векторы экспрессии, включающие регуляторные компоненты из эукариотических вирусов, таких как ретровирусы. Векторы SV40 включают pSVT7 и pMT2. В некоторых вариантах реализации, векторы, полученные из вируса папилломы крупного рогатого скота, включают pBV-1MTNA и векторы, полученные из вируса Эпштейна-Барр, включают pHEBO и p2O5. Другие примеры векторов включают pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, бакуловирусный pDSVE и любой другой вектор, позволяющий экспрессию белков под контролем раннего промотора SV-40, позднего промотора SV-40, промотора металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши, промотора вируса саркомы Рауса, промотора полиэдрина или других промоторов, которые эффективны для экспрессии в эукариотических клетках.

[0208] В некоторых вариантах реализации, рекомбинантные вирусные векторы полезны для экспрессии *in vivo* факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению, поскольку они дают такие преимущества, как латеральная инфекция и специфичность нацеливания. В одном варианте реализации латеральная инфекция заложена в жизненном цикле, например, ретровируса, и представляет собой процесс, с помощью которого единственная инфицированная клетка продуцирует множество поколений вирионов, которые отпочковываются и заражают соседние клетки. В одном варианте реализации это приводит к тому, что быстро становится инфицированной большая область, большая часть которой не была изначально инфицирована исходными вирусными частицами. В одном варианте реализации получают вирусные векторы, которые не способны распространяться латерально. В одном варианте реализации данное свойство может быть полезно, если желательной целью является введение определенного гена лишь в ограниченное количество целевых клеток.

[0209] В одном варианте реализации для введения вектора экспрессии согласно настоящему изобретению в клетки можно применять различные способы. Такие способы в общих чертах описаны в Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Нью-Йорк (1989, 1992), в Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Балтимор, Мэриленд (1989), Chang и др., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega и др., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa и др. (*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986), и включают, например, стабильную или временную трансфекцию, липофекцию,

электропорацию и инфекцию рекомбинантными вирусными векторами. Кроме того, описание способов положительной-отрицательной селекции см. в патентах США с номерами 5464764 и 5487992, включенных в данную заявку посредством ссылки.

[0210] В некоторых вариантах реализации, введение нуклеиновой кислоты путем вирусной инфекции дает несколько преимуществ над другими способами, такими как липофекция и электропорация, поскольку вследствие инфекционной природы вирусов можно добиться более эффективной трансфекции.

[0211] В одном варианте реализации должно быть очевидно, что сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению также можно экспрессировать с конструкции нуклеиновой кислоты, которую вводят индивиду, используя любой подходящий способ введения, описанный выше в настоящем тексте (т.е., генотерапия *in vivo*). В одном варианте реализации конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в подходящую клетку с помощью подходящего носителя/способа доставки генов (трансфекции, трансдукции, гомологичной рекомбинации и т.д.) и системы экспрессии, при необходимости, а затем модифицированные клетки растят в культуре и возвращают в индивида (т.е., генотерапия *ex vivo*).

[0212] В одном варианте реализации применяют векторы экспрессии в растениях. В одном варианте реализации экспрессия последовательности, кодирующей полипептид, запускается множеством промоторов. В некоторых вариантах реализации, применяют вирусные промоторы, такие как промоторы 35S РНК и 19S РНК CaMV (Brisson и др., Nature 310:511-514 (1984)), или промотор белка оболочки TMV (Takamatsu и др., EMBO J. 6:307-311 (1987)). В другом варианте реализации применяют промоторы растений, такие как, например, малая субъединица RUBISCO (Coruzzi и др., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); и Brogli и др., Science 224:838-843 (1984)), или промоторы белков теплового шока, например, hsp17.5-E или hsp17.3-B сои (Gurley и др., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)). В одном варианте реализации конструкции вводят в клетки растений, применяя плазмиду Ti, плазмиду Ri, вирусные векторы растений, прямую трансформацию ДНК, микроинъекцию, электропорацию и другие методики, хорошо известные квалифицированному специалисту. См., например, Weissbach & Weissbach (Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, раздел VIII, стр. 421-463 (1988)). Другие системы экспрессии, такие как системы клеток-хозяев насекомых и млекопитающих, которые хорошо известны в данной области, также можно применять в настоящем изобретении.

[0213] Должно быть очевидно, что кроме необходимых компонентов для транскрипции и трансляции внедренной кодирующей последовательности (кодирующей указанный

полипептид), экспрессионная конструкция согласно настоящему изобретению также может включать последовательности, сконструированные для оптимизации стабильности, продукции, очистки, выхода или активности экспрессируемого полипептида.

[0214] В некоторых вариантах реализации, трансформированные клетки культивируют при эффективных условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии больших количеств рекомбинантных сконструированных факторов свертывания крови. В некоторых вариантах реализации, эффективные условия культивирования включают, но не ограничены перечисленными, эффективные среды, биореактор, температуру, pH и кислородные условия, которые позволяют продуцировать белок. В одном варианте реализации эффективная среда относится к любой среде, в которой культивируют клетку с получением рекомбинантного полипептида согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации, среда обычно включает водный раствор, содержащий усваиваемые источники углерода, азота и фосфата и подходящие соли, минеральные вещества, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. В некоторых вариантах реализации, клетки согласно настоящему изобретению можно культивировать в обычных ферментационных биореакторах, встряхиваемых колбах, пробирках, микротитрационных чашках и чашках Петри. В некоторых вариантах реализации, культивирование осуществляют при температуре, pH и содержании кислорода, подходящих для рекомбинантной клетки. В некоторых вариантах реализации, определение условий культивирования находится в рамках компетенции среднего специалиста в данной области.

[0215] В некоторых вариантах реализации, в зависимости от вектора и системы хозяина, используемого для продукции, полученные сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению либо остаются в рекомбинантной клетке, секретируются в ферментационную среду, секретируются в пространство между двумя клеточными мембранами, такое как периплазматическое пространство у *E. coli*; либо удерживаются на внешней поверхности клетки или вирусной мембране.

[0216] В одном варианте реализации после заранее определенного времени культивирования, осуществляют получение рекомбинантного сконструированного фактора свертывания крови.

[0217] В одном варианте реализации формулировка "получение рекомбинантного сконструированного фактора свертывания крови", используемая в настоящем тексте, относится к сбору цельной ферментационной среды, содержащей полипептид, и не обязательно предполагает дополнительные этапы выделения или очистки.

[0218] В одном варианте реализации сконструированные факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению очищают, применяя множество стандартных методик очистки белка, таких как, не ограничиваясь перечисленными, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, фильтрация, электрофорез, хроматография гидрофобных взаимодействий, гельфильтрационная хроматография, обращенно-фазовая хроматография, хроматография на конканавалине А, хроматофокусирование и дифференциальное растворение.

[0219] В одном варианте реализации чтобы облегчить получение, экспрессированную кодирующую последовательность можно разработать таким образом, чтобы она кодировала сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению, слитый с отщепляемой молекулой. В одном варианте реализации слитый белок можно разработать таким образом, чтобы полипептид можно было легко выделить с помощью аффинной хроматографии; например, путем иммобилизации на колонке, специфично связывающей отщепляемую молекулу. В одном варианте реализации между сконструированным фактором свертывания крови и отщепляемой молекулой разрабатывают сайт расщепления, и полипептид можно высвободить из хроматографической колонки путем обработки подходящим ферментом или агентом, который специфично отщепляет слитый белок в данном сайте (см., например, Booth и др., *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); и Gardella и др., *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)).

[0220] В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению получают в "по существу чистой" форме.

[0221] В одном варианте реализации формулировка "по существу чистый" относится к чистоте, которая обеспечивает возможность эффективного использования данного белка в применениях, описанных в настоящем тексте.

[0222] В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению также можно синтезировать, применяя системы экспрессии *in vitro*. В одном варианте реализации способы синтеза *in vitro* хорошо известны в данной области и компоненты данной системы доступны для приобретения.

[0223] В некоторых вариантах реализации, рекомбинантные сконструированные факторы свертывания крови синтезируют и очищают; их терапевтическую эффективность можно проанализировать либо *in vivo*, либо *in vitro*. В одном варианте реализации активности связывания рекомбинантных сконструированных факторов свертывания крови согласно настоящему изобретению можно установить, применяя различные анализы, известные специалисту в данной области.

[0224] В другом варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать индивиду сам по себе. В одном варианте реализации сконструированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать индивиду в составе фармацевтической композиции, в которой он смешан с фармацевтически приемлемым носителем.

[0225] В другом варианте реализации "фармацевтическая композиция" относится к препарату одного или более активных ингредиентов, описанных в настоящем тексте, с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Целью получения фармацевтической композиции является облегчение введения соединения в организм.

[0226] В другом варианте реализации "активный ингредиент" относится к интересующей полипептидной последовательности, которая отвечает за биологический эффект.

[0227] В другом варианте реализации любая из композиций согласно настоящему изобретению будет содержать по меньшей мере одну последовательность СТР, связанную только с карбоксильным концом интересующего сконструированного фактора свертывания крови, в любой форме. В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложены комбинированные лекарственные средства. В одном варианте реализации "комбинированное лекарственное средство" означает, главным образом, "набор из частей" в том смысле, что комбинированные компоненты, описанные выше, можно дозировать независимо или путем применения различных заданных комбинаций с различными количествами комбинированных компонентов, т.е. одновременно, параллельно, отдельно или последовательно. В некоторых вариантах реализации, части указанного набора из частей затем можно, например, вводить одновременно или с разнесением во времени, а именно, в различные моменты времени и с равными или различными интервалами времени для любой части набора из частей. Соотношение суммарных количеств комбинированных компонентов, в некоторых вариантах реализации, можно вводить в виде комбинированного лекарственного средства. В одном варианте реализации комбинированное лекарственное средство можно изменять, например, чтобы удовлетворить нуждам субпопуляции пациентов, которых нужно лечить, или нуждам одного пациента, который может нуждаться в отличном лекарственном средстве вследствие конкретного заболевания, тяжести заболевания, возраста, пола или массы тела, что может легко осуществить специалист в данной области.

[0228] В другом варианте реализации формулировки "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые используются

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

[0229] В другом варианте реализации "вспомогательное вещество" относится к инертному веществу, которое добавляют в фармацевтическую композицию, чтобы дополнительно способствовать введению активного ингредиента. В одном варианте реализации вспомогательные вещества включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

[0230] Методики получения и введения лекарственных средств можно найти в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, последнее издание, которое включено в данную заявку посредством ссылки.

[0231] В настоящем изобретении предполагаются различные варианты реализации диапазонов доз. Дозировка сконструированного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, в одном варианте реализации находится в диапазоне 0,005-100 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,005-5 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,01-50 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,1-20 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,1-10 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,01-5 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,001-0,01 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,001-0,1 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,1-5 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,5-50 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,2-15 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 0,8-65 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 1-50 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 8-15 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 10-20 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 20-40 мг/день. В другом варианте реализации дозировка находится в диапазоне 60-120 мг/день. В другом варианте



реализации дозировка составляет 1-90 мг/неделю. В другом варианте реализации дозировка составляет 1-90 мг/9 дней. В другом варианте реализации дозировка составляет 1-90 мг/11 дней. В другом варианте реализации дозировка составляет 1-90 мг/14 дней.

[0236] В другом варианте реализации дозировка фактора свертывания крови составляет 10-50 мг/день. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/2 дня. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/3 дня. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/4 дня. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/5 дней. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/6 дней. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/неделю. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/9 дней. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/11 дней. В другом варианте реализации дозировка составляет 10-50 мг/14 дней.

[0237] В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, входит в состав интраназальной лекарственной формы. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, входит в состав инъекционной лекарственной формы. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,0001 мг до 0,6 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,001 мг до 0,005 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,005 мг до 0,01 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,01 мг до 0,3 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,2 мг до 0,6 мг. В другом варианте реализации на N-конце фактора свертывания крови отсутствуют СТР.

[0238] В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 1-100 микрограмм. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне 10-80 микрограмм. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу

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

[0239] В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 0,2 мг до 2 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 2 мг до 6 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 4 мг до 10 мг. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от 5 мг до 15 мг.

[0240] В одном варианте реализации дозировка СТР-модифицированного FIX включает 50% от количества FIX, вводимого пациентам в течение того же периода времени в рекомендуемой дозировке рекомбинантного FIX (например, Benefix®, Wyeth или Mononine®, CSL Behring). В одном варианте реализации дозировка СТР-модифицированного FVIIa включает 50% от количества FVIIa, вводимого пациентам в течение того же периода времени в рекомендуемой дозировке рекомбинантного FVIIa (например, NovoSeven®). В одном варианте реализации дозировка СТР-модифицированного FVII включает 50% от количества FVII, вводимого пациентам в течение того же периода времени в рекомендуемой дозировке рекомбинантного FVII. Например, если NovoSeven® дают пациенту до или после операции в дозе, равной 90 мкг/кг, каждые два часа (т.е., 7,65 мг каждые два часа или 45,9 мг шестью дозами в течение 12 часов, для пациента массой 85 кг), СТР-модифицированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать в дозе, которая

составляет 50% от 12-часовой дозы рекомбинантного FVIIa для данного пациента (т.е., в дозе 23 мг, которую дают однократно в течение 12 часов).

[0241] В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 45% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 10% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 25% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 35% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 75% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. В другом варианте реализации дозировка СТР-модифицированного фактора свертывания крови такова, что она включает 100% от количества фактора свертывания крови, которое вводят, применяя не модифицированный СТР фактор свертывания крови. Тем не менее, даже если дозировка включает такое же количество фактора свертывания крови (например, FIX), как и количество не модифицированного СТР фактора свертывания крови, она все же предпочтительна для субъектов, так как ее будут вводить реже благодаря увеличенному периоду полужизни по сравнению с рекомбинантными факторами свертывания крови.

[0242] В другом варианте реализации терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови находится в диапазоне 50-500 МЕ на кг массы тела, и его вводят от одного раза в день до одного раза в неделю для FIX или 10 мкг/кг - 500 мкг/кг для FVIIa. В другом варианте реализации терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови составляет 150-250 МЕ на кг массы тела, и его вводят раз в день. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, составлена с такой дозой, которая эффективна для введения пациенту - человеку с помощью различных способов.

[0243] В одном варианте реализации FIX вводят в количестве, эффективном для достижения активности фактора IX в кровотоке у субъекта до 20-30 МЕ/дл. В другом

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

[0244] В одном варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту еженедельно. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту два раза в неделю. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту раз в две недели (один раз каждые две недели). В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту два раза в месяц. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту раз в месяц. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту ежедневно. В другом варианте реализации СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту раз в два дня.

[0245] В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в три дня. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в четыре дня. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в пять дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в шесть дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 7-14 дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 10-20 дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 5-15 дней. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, вводят субъекту раз в 15-30 дней.

[0246] В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают повышение исполнительности пациента в отношении применения терапии фактором свертывания крови, включающей введение субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, включающего фактор свертывания крови и по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым повышая исполнительность пациента в отношении применения терапии фактором свертывания крови.

[0247] В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают повышение исполнительности пациентов, страдающих от хронических заболеваний, которые нуждаются в терапии фактором свертывания крови. В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению позволяют уменьшить частоту введения фактора свертывания крови путем модификации СТР фактора свертывания крови, описанной выше в настоящем тексте.

[0248] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FVIIa.

[0249] В другом варианте реализации термин "исполнительность" включает соблюдение указаний. В другом варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают повышение исполнительности пациентов, нуждающихся в терапии фактором свертывания крови, путем уменьшения частоты введения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются благодаря модификации СТР, которая делает СТР-модифицированный фактор свертывания крови более стабильным. В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются в результате увеличения  $T_{1/2}$  фактора свертывания крови. В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются в результате увеличения времени клиренса или уменьшения скорости выведения фактора свертывания крови.

[0250] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FVIIa.

[0251] В другом варианте реализации уменьшения частоты введения фактора свертывания крови добиваются в результате увеличения меры AUC фактора свертывания крови.

[0252] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ уменьшения частоты введения фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до десяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым уменьшая частоту введения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ уменьшения частоты введения фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от одного до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым уменьшая частоту введения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ уменьшения частоты введения фактора свертывания крови, включающий этап присоединения трех СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым уменьшая частоту введения фактора свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ уменьшения частоты введения фактора свертывания крови, включающий этап присоединения от трех до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым уменьшая частоту введения фактора свертывания крови.

[0253] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ повышения исполнительности в отношении применения терапии фактором свертывания крови, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым повышая исполнительность в отношении применения терапии фактором свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке

предложен способ повышения исполнительности в отношении применения терапии фактором свертывания крови, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым повышая исполнительность в отношении применения терапии фактором свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ повышения исполнительности в отношении применения терапии фактором свертывания крови, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым повышая исполнительность в отношении применения терапии фактором свертывания крови. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ повышения исполнительности в отношении применения терапии фактором свертывания крови, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым повышая исполнительность в отношении применения терапии фактором свертывания крови.

[0254] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, тем самым осуществляя лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, , что обеспечивает предотвращение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и три

карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, , что обеспечивает предотвращение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, , что обеспечивает предотвращение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта.

[0255] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ предотвращения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему предупреждают гемофилию у указанного субъекта.

[0256] В другом варианте реализации в настоящем изобретении показали, что композиции, предложенные в настоящем тексте, неожиданно более эффективно всасывались в кровоток после п/к введения (см. примеры 7-9 в настоящем тексте). Возможность подкожного введения FVIIa является преимуществом, так как его можно

использовать для профилактических применений. Подкожные инъекции пациентам также гораздо легче вводить самим себе, и это является преимуществом, когда пациенты очень молоды и их вены малы, и их трудно обнаружить.

[0257] В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации в настоящей заявке предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида, включающего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта.

[0258] Пероральное введение, в одном варианте реализации включает стандартную лекарственную форму, включающую таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания, жевательные таблетки, суспензии, эмульсии и тому подобные формы. Такие стандартные лекарственные формы включают безопасное и эффективное количество желательного фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, каждое из которых представляет собой один вариант реализации, от приблизительно 0,7 или 3,5 мг до приблизительно 280 мг/70 кг или, в другом варианте реализации от приблизительно 0,5 или 10 мг до приблизительно 210 мг/70 кг. Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения стандартных лекарственных форм для перорального введения, хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах реализации, таблетки, как правило, включают обычные фармацевтически совместимые адъюванты, такие как инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, маннит, лактоза и

целлюлоза; связующие вещества, такие как крахмал, желатин и сахароза; разрыхлители, такие как крахмал, альгиновая кислота и кроскармеллоза; лубриканты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. В одном варианте реализации можно применять скользящие вещества, такие как диоксид кремния, для улучшения свойств текучести порошкообразной смеси. В одном варианте реализации для лучшего внешнего вида можно добавлять красители, такие как красители FD&C. Подсластители и ароматизирующие агенты, такие как аспартам, сахарин, ментол, перечная мята и фруктовые вкусоароматические добавки, представляют собой полезные адъюванты для жевательных таблеток. Капсулы обычно содержат один или более твердых разбавителей, описанных выше. В некоторых вариантах реализации, выбор компонентов носителя зависит от вторичных факторов, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не являются критичными для целей настоящего изобретения, и специалист в данной области может легко сделать такой выбор.

[0259] В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма включает заранее заданный профиль высвобождения. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки пролонгированного высвобождения. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки замедленного высвобождения. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки немедленного высвобождения. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма составлена с учетом желательного профиля высвобождения фармацевтически активного ингредиента, как известно специалисту в данной области.

[0260] Пероральные композиции, в некоторых вариантах реализации, включают жидкие растворы, эмульсии, суспензии и т. п. В некоторых вариантах реализации, фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения таких композиций, хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах реализации, жидкие пероральные композиции содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,933% желательного соединения или соединений или, в другом варианте реализации от приблизительно 0,01% до приблизительно 10%.

[0261] В некоторых вариантах реализации, композиции для применения в способах согласно настоящему изобретению включают растворы или эмульсии, которые, в некоторых вариантах реализации, представляют собой водные растворы или эмульсии,

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

[0262] В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют в мышцу (внутримышечная инъекция). В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют под кожу (подкожная инъекция). В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют в мышцу. В другом варианте реализации полипептид, включающий фактор свертывания крови и по меньшей мере одну молекулу СТР, инъецируют в кожу. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, вводят путем системного введения. В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, вводят путем внутривенной инъекции. В другом варианте реализации введение можно осуществлять парентерально, пульмонально, перорально, топически, внутрикожно, внутримышечно, интраперитонеально, внутривенно, подкожно, интраназально, трансназально, внутриглазным путем, офтальмически, эпидурально, буккально, ректально, трансмукозально, путем доставки в кишечник или парентерально, включая интрамедуллярные инъекции, а также путем интратекального или непосредственного интравентрикулярного введения.

[0263] В другом варианте реализации композицию вводят скорее местным, чем системным путем, например, путем инъекции композиции непосредственно в определенную область организма пациента.

[0264] В одном варианте реализации путь введения может быть энтеральным. В другом варианте реализации путь может быть конъюнктивальным, трансдермальным, внутрикожным, интраартериальным, вагинальным, ректальным, внутриопухолевым, параканцеральным, трансмукозальным, внутримышечным, внутрисосудистым, интравентрикулярным, интракраниальным, интраназальным, сублингвальным или комбинацией перечисленных путей.

[0265] В другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят путем внутривенной, интраартериальной или внутримышечной инъекции жидкой композиции. В

некоторых вариантах реализации, жидкие лекарственные формы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и тому подобные формы. В одном варианте реализации фармацевтические композиции вводят внутривенно, и следовательно, они составлены в форме, подходящей для внутривенного введения. В другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят внутриартериально, и следовательно, они составлены в форме, подходящей для внутриартериального введения. В другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят внутримышечно, и следовательно, они составлены в форме, подходящей для внутримышечного введения.

[0266] Кроме того, в другом варианте реализации фармацевтические композиции вводят топически на поверхности тела и, следовательно, они составлены в форме, подходящей для топического введения. Подходящие топические лекарственные формы включают гели, мази, кремы, лосьоны, капли и тому подобные формы. Для топического введения, соединения согласно настоящему изобретению комбинируют с дополнительным подходящим терапевтическим агентом или агентами, и их получают и применяют в виде растворов, суспензий или эмульсий в физиологически приемлемом разбавителе с добавлением или без фармацевтического носителя.

[0267] В одном варианте реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению получают с помощью процессов, хорошо известных в данной области, например, с помощью процессов обычного смешивания, растворения, гранулирования, получения драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации.

[0268] В одном варианте реализации фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением составлены обычным способом с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, включающих вспомогательные вещества и добавки, которые способствуют получению из активных ингредиентов композиций, которые можно применять в фармацевтике. В одном варианте реализации лекарственная форма зависит от выбранного пути введения.

[0269] В одном варианте реализации инъекционные лекарственные средства согласно настоящему изобретению составлены в виде водных растворов. В одном варианте реализации инъекционные лекарственные средства согласно настоящему изобретению составлены с применением физиологически совместимых буферов, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. В некоторых вариантах реализации, для трансмукозального введения в лекарственной форме применяют проникающие вещества, подходящие для барьера, через который нужно проникнуть. Такие проникающие вещества общеизвестны в данной области.

[0270] В одном варианте реализации композиции, описанные в настоящем тексте, входят в состав лекарственной формы для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В некоторых вариантах реализации, лекарственные формы для инъекции представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах возможно с добавлением консерванта. В некоторых вариантах реализации, композиции представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в маслянистых или водных средах и включают такие вспомогательные агенты, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[0271] Композиции также включают, в некоторых вариантах реализации, консерванты, такие как хлорид бензалкония и тимеросал и тому подобные консерванты; хелатирующие агенты, такие как эдетат натрия и другие хелатирующие агенты; буферы, такие как фосфат, цитрат и ацетат; регулирующие тоничность агенты, такие как хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннит и другие регулирующие тоничность агенты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистин, метабисульфат натрия и другие антиоксиданты; ароматические агенты; регулирующие вязкость агенты, такие как полимеры, включая целлюлозу и ее производные; и поливиниловый спирт и кислоту и основания для регулирования pH данных водных композиций при необходимости. Композиции также включают, в некоторых вариантах реализации, местные обезболивающие средства или другие активные вещества. Композиции можно применять в виде спреев, аэрозолей, капель и тому подобных форм.

[0272] В некоторых вариантах реализации, фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активного лекарственного средства в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных ингредиентов, в некоторых вариантах реализации, получают в виде суспензий для инъекций на подходящей масляной или водной основе. Подходящие липофильные растворители или среды включают, в некоторых вариантах реализации, жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды или липосомы. Водные суспензии для инъекций включают, в некоторых вариантах реализации, вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. В другом варианте реализации суспензия также содержит подходящие стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость активных ингредиентов, чтобы обеспечить возможность получения высококонцентрированных растворов.

[0273] В другом варианте реализации активное соединение можно доставлять в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat и др., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein и Fidler (ред.), Liss, Нью-Йорк, стр. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, стр. 317-327; J. E. Diederichs и др., *Pharm./nd.* 56 (1994) 267- 275).

[0274] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, доставляемая в системе с контролируемым высвобождением, составлена для внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте реализации применяют насос (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald и др., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek и др., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). В другом варианте реализации можно применять полимерные материалы. В еще одном варианте реализации систему с контролируемым высвобождением можно поместить в непосредственной близости от терапевтической мишени, т.е., головного мозга, таким образом, потребуется лишь часть от дозы для системного введения (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, том 2, стр. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

[0275] В некоторых вариантах реализации, активный ингредиент находится в виде порошка для разбавления подходящей средой перед применением, например, стерильным апиrogenным водным раствором. Композиции, в некоторых вариантах реализации, составлены для введения пульверизацией и ингаляцией. В другом варианте реализации композиции содержатся в контейнере с присоединенным к нему пульверизатором.

[0276] В одном варианте реализации лекарственное средство согласно настоящему изобретению включают в состав композиций для ректального введения, таких как суппозитории или удерживающие микроклизмы, применяя, например, обычные основы для суппозитория, такие как масло какао или другие глицериды.

[0277] В некоторых вариантах реализации, фармацевтические композиции, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения предполагаемой цели. В некоторых вариантах реализации, терапевтически эффективное количество означает количество активных ингредиентов, эффективное для предотвращения, облегчения или снижения выраженности симптомов заболевания, или для увеличения выживаемости субъекта, которого лечат.

[0278] В одном варианте реализации определение терапевтически эффективного количества находится в рамках компетенции специалистов в данной области.

[0279] Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей или их компонентов, представляют собой сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и метилцеллюлоза; порошок трагакант; солод; желатин; тальк; твердые лубриканты, такие как стеариновая кислота и стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; полиолы, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновую кислоту; эмульгаторы, такие как эмульгаторы торговой марки Tween™; смачивающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия; красители; ароматизирующие агенты; таблетлирующие агенты, стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; и фосфатные буферные растворы. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, который будут применять совместно с соединением, в основном определяется предполагаемым путем введения соединения. Если заявленное соединение предназначено для инъекции, в одном варианте реализации фармацевтически приемлемый носитель представляет собой стерильный физиологический солевой раствор с совместимым с кровью суспендирующим агентом, рН которого подвели приблизительно до 7,4.

[0280] Кроме того, композиции дополнительно включают связующие вещества (например, гуммиарабик, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), дезинтегрирующие агенты (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, крахмалгликолят натрия), буферы (например, Трис-НСl, ацетат, фосфат) с различными рН и ионной силой, вспомогательные вещества, такие как альбумин или желатин, для предотвращения поглощения поверхностями, детергенты (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, соли желчных кислот), ингибитор протеазы, поверхностно-активные вещества (например, лаурилсульфат натрия), усилители проникновения, солюбилизующие агенты (например, глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), повышающие вязкость агенты (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, аспартам, лимонную кислоту), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), лубриканты (например, стеариновую кислоту, стеарат

магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), агент для повышения текучести (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия), полимерные покрытия (например, полуксамеры или полуксамины), покрытие и пленкообразующие агенты (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адъюванты.

[0281] Обычные компоненты носителей для сиропов, эликсиров, эмульсий и суспензий включают этанол, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, жидкую сахарозу, сорбит и воду. Для суспензии, обычные суспендирующие агенты включают метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, целлюлозу (например, Avicel™, RC-591), трагакант и альгинат натрия; обычные смачивающие агенты включают лецитин и полиэтиленоксидсорбитан (например, полисорбат 80). Обычные консерванты включают метилпарабен и бензоат натрия. В другом варианте реализации пероральные жидкие композиции также включают один или более таких компонентов, как подсластители, ароматизирующие агенты и красители, описанные выше.

[0282] Композиции также включают включение или нанесение активного материала на препараты полимерных соединений в форме частиц, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, гидрогели и т.д., или на липосомы, микроэмульсии, мицеллы, моноламеллярные или мультиламеллярные везикулы, тени эритроцитов или сферопласты. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*.

[0283] В объем настоящего изобретения также входят композиции в форме частиц, покрытые полимерами (например, полуксамерами или полуксаминами), и соединение, соединенное с антителами, направленными против тканеспецифичных рецепторов, лигандов или антигенов, или соединенное с лигандами тканеспецифичных рецепторов.

[0284] В некоторых вариантах реализации, соединения модифицированы ковалентным присоединением водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон или полипролин. В другом варианте реализации модифицированные соединения обладают по существу большим периодом полужизни из крови после внутривенной инъекции, чем таковой у соответствующих немодифицированных соединений. В одном варианте реализации модификации также повышают растворимость соединения в водном растворе, предотвращают агрегацию, повышают физическую и химическую стабильность соединения и сильно уменьшают иммуногенность и реакционную способность соединения. В другом варианте реализации

желательной биологической активности *in vivo* добиваются введением таких абдуктов полимер-соединение с меньшей частотой или в меньших дозах, чем для немодифицированного соединения.

[0285] В некоторых вариантах реализации, получение эффективного количества или дозы можно сначала оценить в анализах *in vitro*. В одном варианте реализации дозу можно определить в моделях на животных, и полученную информацию можно использовать для более точного определения полезных доз у людей.

[0286] В одном варианте реализации токсичность и терапевтическую эффективность активных ингредиентов, описанных в настоящем тексте, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур *in vitro*, культур клеток или экспериментальных животных. В одном варианте реализации результаты, полученные с помощью таких анализов *in vitro* и культур клеток и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона дозировок для применения у человека. В одном варианте реализации дозировки изменяют в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. В одном варианте реализации конкретную лекарственную форму, путь введения и дозировку может выбрать лечащий врач с учетом состояния пациента (см., например, Fingl, и др., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", глава 1, стр. 1).

[0287] В одном варианте реализации в зависимости от тяжести и восприимчивости к лечению состояния, от которого лечат, введение доз можно осуществлять однократным или многократным введением, при этом курс лечения длится от нескольких дней до нескольких недель или до тех пор, пока не достигнут излечения или пока не добьются ослабления симптомов болезненного состояния.

[0288] В одном варианте реализации количество композиции, которое будут вводить, конечно, будет зависеть от субъекта, которого лечат, тяжести заболевания, способа введения, мнения лечащего врача и т.д.

[0289] В одном варианте реализации также получают композиции, содержащие лекарственное средство согласно настоящему изобретению, входящее в состав лекарственной формы вместе с совместимым фармацевтическим носителем, помещают в подходящий контейнер и маркируют, что она подходит для лечения указанного состояния.

[0290] В другом варианте реализации фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, представляет собой лиофилизированное (т.е., высушенное сублимацией) лекарственное средство в комбинации с совокупностью органических вспомогательных веществ и стабилизаторов, таких как неионогенные поверхностно-

активные агенты (т.е., поверхностно-активные вещества), различные сахара, органические полиолы и/или сывороточный альбумин человека. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит описанный лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильной воде для инъекции. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит описанный лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильном ФБР для инъекции. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит описанный лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильном 0,9% NaCl для инъекции.

[0291] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и совокупность носителей, таких как сывороточный альбумин человека, полиолы, сахара и анионные поверхностно-активные стабилизирующие агенты. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и лактобионовую кислоту и ацетатный/глициновый буфер. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и аминокислоты, такие как аргинин или глутамат, которые повышают растворимость композиций интерферона в воде. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и глицин или сывороточный альбумин человека (ЧСАч), буфер (например, ацетатный) и изотонический агент (например, NaCl). В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, и фосфатный буфер, глицин и ЧСА.

[0292] В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, стабилизируют путем помещения в буферные растворы, обладающие рН между приблизительно 4 и 7,2. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, помещают в буферный раствор, обладающий рН между приблизительно 4 и 8,5. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, помещают в буферный раствор, обладающий рН между приблизительно 6 и 7. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, помещают в буферный раствор, обладающий рН, равным приблизительно 6,5. В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, стабилизируют с помощью аминокислоты в качестве

стабилизирующего агента и, в некоторых случаях, с помощью соли (если аминокислота не содержит заряженную боковую цепь).

[0293] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, представляет собой жидкую композицию, содержащую стабилизирующий агент в количестве между приблизительно 0,3% и 5% по массе, который представляет собой аминокислоту.

[0294] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обеспечивает точность введения и безопасность продукта. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обеспечивает биологически активную, стабильную жидкую лекарственную форму для применения в виде инъекции. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит нелиофилизированный фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте.

[0295] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, обеспечивает жидкую лекарственную форму, позволяющую хранение в течение длительного периода времени в жидком состоянии, что упрощает хранение и транспортировку перед введением.

[0296] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, содержит твердые липиды в качестве материала матрицы. В другом варианте реализации инъеклируемая фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, содержит твердые липиды в качестве материала матрицы. В другом варианте реализации получение липидных микрочастиц путем распылительной кристаллизации описано у Speiser (Speiser и др., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54), из которых затем получают липидные наногранулы для перорального введения (Speiser EP 0167825 (1990)). В другом варианте реализации липиды, которые используют, хорошо переносятся организмом (например, глицериды, состоящие из жирных кислот, которые присутствуют в эмульсии для парентерального введения).

[0297] В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает полимерные микрочастицы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает наночастицы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описанный в настоящем тексте, включает липосомы. В другом

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

[0298] В одном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению представлены в упаковке или в дозирующем устройстве, таком как одобренный Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (FDA) набор, который включает одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном варианте реализации упаковка, например, включает металлическую или полимерную пленку, например, блистерную упаковку. В одном варианте реализации упаковка или дозирующее устройство сопровождается инструкциями для введения. В одном варианте реализации упаковка или дозирующее устройство сопровождается уведомлением, сопровождающим контейнер, в виде, предусмотренном государственным органом, регулирующим производство, применение или реализацию лекарственных средств, и на этом уведомлении отражено одобрение данным органом формы данных композиций или введения человеку или животному. Такое уведомление, в одном варианте реализации представляет собой этикетку, одобренную Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США для лекарственных средств рецептурного отпуска, или одобренный листок-вкладыш.

[0299] В одном варианте реализации должно быть очевидно, что факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению можно давать индивиду совместно с дополнительными активными агентами, чтобы добиться улучшенного терапевтического действия, по сравнению с лечением каждым агентом отдельно. В другом варианте реализации принимают меры (например, выбор дозировки и дополнительного агента),

чтобы избежать неблагоприятных побочных действий, которые связаны с комбинированными методами лечения.

[0300] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

[0301] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

[0302] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0303] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0304] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0305] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии, включающий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора VIIa (FVIIa) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0306] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения биологического периода полужизни полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa,

вследствие чего продлевается биологический период полужизни указанного полипептида FVIIa.

[0307] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего увеличивается AUC указанного полипептида FVIIa.

[0308] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FVIIa.

[0309] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FVIIa.

[0310] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, что позволяет получить СТР-модифицированный полипептид FVIIa.

[0311] В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора VIIa (FVIIa), включающего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта.

[0312]

[0313] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полипептид СТР-модифицированного фактора IX (FIX), состоящий из полипептида FIX и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного СТР-модифицированного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, при этом последовательность указанного СТР-

модифицированного полипептида FIX представляет собой последовательность, описанную в SEQ ID NO: 31. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен СТР-модифицированный полипептид FIX, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

[0314] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая указанный СТР-модифицированный полипептид FIX.

[0315] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида фактора IX (FIX) и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, при этом последовательность указанного полинуклеотида описана в SEQ ID NO: 30. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен полинуклеотид, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь. В другом варианте реализации согласно

настоящему изобретению предложен вектор экспрессии, содержащий указанный полинуклеотид.

[0316] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена клетка, содержащая вектор экспрессии.

[0317] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая вектор экспрессии.

[0318] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения биологического периода полужизни полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего продлевается биологический период полужизни указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

[0319] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC) полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего увеличивается AUC указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В

другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

[0320] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения частоты введения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, что позволяет уменьшить частоту введения указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

[0321] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения скорости выведения полипептида фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, вследствие чего уменьшается скорость выведения указанного полипептида FIX. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

[0322] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ получения полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающий этап присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического

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

[0323] В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение указанному субъекту полипептида СТР-модифицированного фактора IX (FIX), включающего полипептид FIX и три карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FIX, благодаря чему лечат гемофилию у указанного субъекта. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором последовательность указанного СТР-модифицированного полипептида FIX представляет собой последовательность, описанную в SEQ ID NO: 31. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР кодируется последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР укорочен. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором по меньшей мере один СТР присоединен к указанному полипептиду FIX посредством линкера. В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

[0324] В данной области широко известно, что модифицированные пептиды и белки согласно настоящему изобретению можно соединить с метками, лекарственными

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

[0325] Аналогичные методики связывания, наряду с другими, можно применять для соединения модифицированных пептидов и белков согласно настоящему изобретению с твердыми подложками. После присоединения, данные модифицированные пептиды и белки затем можно применять в качестве аффинных реагентов для отделения желательных компонентов, с которыми происходит специфичное связывание.

[0326] Наконец, модифицированные пептиды и белки согласно настоящему изобретению можно применять для получения антител, в частности, иммунореактивных с данными новыми соединениями. Данные антитела полезны для множества диагностических и терапевтических применений, в зависимости от природы биологической активности немодифицированного пептида или белка. Должно быть очевидно, что согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые иммунореактивны с СТР-модифицированным FIX, FVII или FVIIa, описанными в настоящем тексте. В одном варианте реализации такие антитела можно применять для того, чтобы отличить или идентифицировать СТР-модифицированные факторы свертывания крови, которые ввели, от эндогенных факторов свертывания крови. В другом варианте реализации антитела можно применять, чтобы определить местонахождение введенных СТР-модифицированных факторов свертывания крови.

[0327] Дополнительные предметы, преимущества и новые свойства настоящего изобретения станут очевидны для среднего специалиста в данной области после изучения следующих примеров, которые не предполагаются как ограничивающие. Кроме того, каждый из различных вариантов реализации и аспектов настоящего изобретения, описанных выше в настоящем тексте и заявленных в формуле изобретения ниже, находит экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

## ПРИМЕРЫ

[0328] В целом терминология, используемая в настоящем тексте и лабораторные процедуры, используемые в настоящем изобретении, включают молекулярные, биохимические, микробиологические методики и технологии рекомбинантной ДНК. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook и др., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", тома I-III, Ausubel, R. M., ред. (1994); Ausubel и др., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Балтимор, Мэриленд (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Нью-Йорк (1988); Watson и др., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Нью-Йорк; Birren и др. (ред.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", тома 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк (1998); методики, описанные в патентах США с номерами 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", тома I-III, Cellis, J. E., ред. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), третье издание; "Current Protocols in Immunology", тома I-III, Coligan J. E., ред. (1994); Stites и др. (ред.), "Basic and Clinical Immunology" (8ое издание), Appleton & Lange, Норуолк, Коннектикут (1994); Mishell и Shiigi (ред.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman и Co., Нью-Йорк (1980); доступные иммуноанализы подробно описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США с номерами 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ред. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., и Higgins S. J., ред. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., и Higgins S. J., ред. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ред. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) и "Methods in Enzymology", том 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, Сан-Диего, Калифорния (1990); Marshak и др., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); каждая из которых включена посредством ссылки. Другие основные ссылки приведены повсюду в настоящем описании.

### ПРИМЕР 1

#### *Получение и применение фактора свертывания крови IX*

[0329] **Клонирование и экспрессия рекомбинантной молекулы FIX**

[0330] Клоны фактора IX конструировали в эукариотическом векторе экспрессии pCI-neo (Promega, номер в каталоге E1841). Клон с открытой рамкой считывания (ОРС) фактора свертывания крови IX *Homo sapiens* заказали в “OriGene” (RC219065). Праймеры заказали в Sigma-Genosys.

[0331] **Конструирование 301-1-pCI-neo-p200-11 (фактор IX-стр x2).**

[0332] Праймер 101: 5' GTTTAGTGAACCGTCAGAAT 3' (SEQ ID NO: 36)

[0333] Праймер 103<sup>R</sup>: 5' TTGAGGAAGATGTTCTGTGTA 3' (содержит сайт SspI фактора IX) (SEQ ID NO: 37)

[0334] Полимеразную цепную реакцию (реакцию ПЦР) осуществляли с праймером 101 и обратным праймером 103<sup>R</sup> и с плазмидной ДНК, клоном кДНК фактора IX (“OriGene” RC219065) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт размером ~ 1085 п.о. (пцр 10), который очищали из геля (фрагмент, содержащий N-конец последовательности фактора IX).

[0335] Праймер 98: 5' ATTACAGTTGTCGCAGGTGA 3' (SEQ ID NO: 38)

[0336] Праймер 99<sup>R</sup> : 5' GCTGGAGCTAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTT 3' (SEQ ID NO: 39)

[0337] Праймер 100: 5' GCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3' (SEQ ID NO: 40)

[0338] Праймер 27<sup>R</sup>: 5' TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG 3' (SEQ ID NO: 41)

[0339] Осуществляли три реакции ПЦР. Первую реакцию осуществляли с праймером 98 и праймером 99<sup>R</sup> и плазмидной ДНК, клоном кДНК фактора IX (“OriGene”, RC219065) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 540 п.о.

[0340] Вторую реакцию осуществляли с праймером 100 и праймером 27<sup>R</sup> и плазмидной ДНК 402-2-p72-3 (hGH-СТР-СТР) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 258 п.о.

[0341] Последнюю реакцию (пцр 3) осуществляли с праймерами 98 и 27<sup>R</sup> и смесью продуктов предыдущих двух реакций в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 790 п.о., который лигировали в клонирующий вектор ТА (Invitrogen, номер в каталоге K2000-01). Выделяли фрагмент, полученный путем обработки рестриктазами SspI–EcoRI (ТА 3-3).

[0342] Другую реакцию ПЦР (пцр 12) осуществляли с праймером 101 и праймером 27<sup>R</sup>, и со смесью продуктов пцр 10 и фрагментом SspI-EcoRI из пцр 3 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 1700 п.о. (фактор IX-стр-стр), который лигировали в клонирующий вектор ТА (Invitrogen, номер в каталоге K2000-01) (лиг 180).

[0343] В последовательности фактора IX обнаружили ошибку, поэтому фрагменты заменили, чтобы получить вставку фактора IX-ctp-ctp с правильной последовательностью ДНК.

[0344] ТА-пцр 3-3 расщепляли рестриктазами SspI и XbaI и выделяли большой фрагмент (вектор). ТА 180-4 расщепляли рестриктазами SspI и XbaI и выделяли малый фрагмент (вставку), который лигировали с выделенным большим фрагментом ТА-пцр-3-3, расщепленным SspI и XbaI. Новую плазмиду ТА-183-2 расщепляли рестриктазами SalI и NotI, и выделяли вставку фактора IX-ctp-ctp (~1575 п.о.). Данный фрагмент встраивали в эукариотический вектор экспрессии pCI-нео (расщепленный SalI и Not I) с получением клона 301-2-p200-11.

[0345] **Конструирование pCI-dhfr –фактор 9- ctp x2 (p223-4).** Вектор pCI-dhfr (p6-1) расщепляли рестриктазами SmaI и NotI. Фактор IX-CTP-CTP (p200-11) расщепляли рестриктазами ASisI F.I. и NotI. Полученные два фрагмента лигировали.

[0346] **Конструирование pCI-dhfr-фактор 9-ctp x3 (p225-7).** Вектор pCI-dhfr OXM-CTP×3 (p216-4) расщепляли рестриктазами XbaI и ApaI. Фактор IX-CTP-CTP (223-4) расщепляли рестриктазами XbaI и ApaI. Полученные два фрагмента лигировали.

[0347] **Конструирование pCI-dhfr-фактор 9-ctp x3 T148A (p243-2).** В плазмиде p225-7, содержащей треонин в положении 148, Thr заменили на Ala, vtntljvсайт-направленного мутагенеза, поскольку наиболее часто встречающийся вариант FIX содержит аланин в данном положении.

[0348] Праймер 75: ctcccagttcaattacagct (SEQ ID NO: 42)

[0349] Праймер 122г: ggaaaaactgcctcagcacgggtgagc (SEQ ID NO: 43)

[0350] Праймер 123: gtgctgaggcagttttctctgatgtggactat (SEQ ID NO: 44)

[0351] Праймер 124г: саасасagtgggcagcag (SEQ ID NO: 45)

[0352] Осуществляли три реакции ПЦР. Первую реакцию осуществляли с праймером 75 и праймером 122г и плазмидной ДНК p225-7 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 692 п.о., который очищали из геля. Вторую реакцию ПЦР осуществляли с праймером 123 и праймером 124г и плазмидной ДНК p225-7 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~237 п.о., который очищали из геля. Третью перекрывающуюся реакцию ПЦР осуществляли с праймерами 75 и 124г и смесью продуктов предыдущих двух реакций в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~ 910 п.о. Полученный продукт перекрывающейся ПЦР расщепляли рестриктазами XbaI и NsiI и заново лигировали в плазмиду p225-7 (расщепленную XbaI и NsiI) с получением плазмиды фактор IX-ctp x3 T148A, обозначенной p243-2.

[0353] **Конструирование FIX-4СТР (p259-4).** Фрагмент 3,5СТР выделяли из охут-4СТР (p254-3) с помощью рестрикционных ферментов Aра1 и Xba1. Фрагмент FIX+0,5СТР выделяли из FIX-3СТР (p243-2) с помощью рестрикционных ферментов Aра1 и Xba1. Полученные два фрагмента лигировали.

[0354] **Конструирование FIX-5СТР (p260-18).** Фрагмент 4,5СТР выделяли из охут-5СТР (255-1) с помощью рестрикционных ферментов Aра1 и Xba1. Фрагмент FIX+0,5СТР выделяли из FIX-3СТР (p243-2), применяя ферменты Aра1 и Xba1. Полученные два фрагмента лигировали.

[0355] Клетки Dg44 высевали на 100 мм чашки для культивирования клеток и растили до конfluenceности 50-60%. Всего 2 мкг (микрограмма) кДНК FIX использовали для трансфекции одной 100 мм чашки, применяя реагент FuGene (Roche) в безбелковой среде (Invitrogene CD Dg44). Среда удаляла через 48 часов после трансфекции и заменяли на безбелковую среду (Invitrogene CD Dg44) без нуклеозидов в присутствии 800 мкг/мл G418 (неомицина). Через 14 дней популяцию трансфицированных клеток переносили во флаконы для культивирования клеток T25 и продолжали селекцию в течение дополнительных 10-14 дней, до тех пор, пока клетки не стали расти как стабильные клоны. Выбирали клоны с высоким уровнем экспрессии. Приблизительно  $2 \times 10^7$  клеток использовали для инокуляции 300 мл ростовой среды в роллерной бутылки 1700 см<sup>2</sup> (Corning, Корнинг, Нью-Йорк), дополненной 5 нг/мл витамина К3 (менадиона натрия бисульфат; Sigma). Кондиционированную среду собирали (собранный продукт) после быстрого снижения жизнеспособности клеток до приблизительно 70%. Кондиционированную среду сначала осветляли, а затем концентрировали приблизительно в 20 раз и диализовали против ФБР, применяя проточную фильтрационную кассету (с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа; Millipore Corp.).

[0356] **Определение уровня антигена FIX.** Уровни антигена в полученном FIX-СТР определяли с помощью набора для ELISA FIX человека AssayMax ELISA FIX (AssayPro-EF1009-1). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по трем различным разведениям в двух независимых экспериментах (фигура 1А, таблица 1).

**Таблица 1.** Рассчитанная концентрация белка

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

[0357] **ЭФ в ПААГ/ДСН - иммуноблоттинг FIX.** Собранный FIX-СТР или очищенный rhFIX (American Diagnostics), по 100 нг белка, загружали на 12% трис-глицериновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя поликлональное антитело к FIX человека и моноклональное антитело, распознающее гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics). Ранее сообщали, что rhFIX мигрировал в геле на уровне 55 кДа, тогда как FIX, слитый с двумя СТР, мигрировал на уровне 75 кДа. Показано, что оба варианта белков FIX-СТР были гамма-карбоксилированными, такая посттрансляционная модификация необходима для активности и функционирования FIX (фигура 1В).

[0358] **Определение хромогенной активности FIX.** Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* собранного FIX-СТР по сравнению с белком rhFIX (American Diagnostics), применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). В присутствии тромбина, фосфолипидов, кальция, избыточные количества FXIa активируют собранный FIX в FIXa. FIXa образует ферментативный комплекс с тромбином, активированным FVIII:C (подаваемым в избыточных количествах), фосфолипидами и кальцием и активирует фактор X, присутствующий в аналитической системе, в FXa. Активность непосредственно коррелирует с количеством FIX, которое является лимитирующим фактором. Затем измеряли удельную активность полученного FXa в отношении хромогенного субстрата FXa (pNA). Полученное количество pNA прямо пропорционально активности FIXa. Готовили серийные разведения rhFIX и собранного FIX-СТР, и оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости собранного FIX с эталонным препаратом, состоящим из rhFIX или плазмы человека. Среднее значение EC50 для FIX составляло 21 нг/мл, тогда как рассчитанное значение EC50 для собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub> составляло 382 нг/мл, и рассчитанное значение EC50 для собранного FIX-СТР составляло 1644 нг/мл. Наблюдали приблизительно 15-кратное снижение ферментативной активности собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub> (фигура 2).

[0359] **Свертывающая активность FIX (АЧТВ).** Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является мерой целостности внутреннего и общего путей каскада свертывания крови. АЧТВ представляет собой время в секундах свертывания плазмы после добавления активатора внутреннего пути, фосфолипида и кальция. Реагент АЧТВ называют частичным тромбопластином, так как тканевый фактор не включен в фосфолипид, в отличие от реагента протромбинового времени (ПВ).

Активатор запускает систему, а затем в присутствии фосфолипида осуществляются остальные этапы внутреннего пути. Эталонный диапазон АЧТВ различается в разных лабораториях, но обычно составляет 27-34 секунды.

[0360] Главной целью анализа являлось количественное определение способности собранного FIX-СТР восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FIX, путем добавления rhFIX. 300 мкл плазмы человека, обедненной FIX, смешивали со 100 мкл rhFIX или собранного FIX-СТР и готовили серийные разведения. После инкубации в течение 60 секунд при 37°C, в смесь добавляли тромбопластин, CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды, и определяли время свертывания крови в секундах (выполняли в American Medical Laboratories). Оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости собранного FIX с эталонным препаратом, состоящим из rhFIX или плазмы человека. Одна единица активности FIX соответствует концентрации FIX, при которой активность равна активности одного мл нормальной плазмы человека. Представленные результаты АЧТВ указывают на то, что FIX-(СТР)<sub>2</sub> продемонстрировал 5,7-кратное снижение удельной коагулирующей активности по сравнению с rhFIX (таблица 2). Более того, результаты АЧТВ вместе с результатами анализа хромогенной активности *in vitro* позволяют предположить, что собранный FIX-(СТР)<sub>2</sub> обладает улучшенной ферментативной активностью по сравнению с собранным FIX-СТР (таблица 2). Улучшенную активность белков FIX-СТР можно получить после оптимизации системы экспрессии (т.е. котрансфекции фурином и оптимизации концентрации в среде витамина К3), которую усиливали после супертрансфекции фурином (результаты не представлены).

**Таблица 2:** Свертывающая активность FIX

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

[0361] **Фармакокинетическое исследование.** RhFIX (American Diagnostic) и собранный FIX-СТР вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество) в дозе 75 мкг/кг массы тела (таблица 3).

**Таблица 3.** План проведения ФК исследования

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

[0362] Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48 и 72 часа после введения. Плазму получали сразу после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Концентрацию FIX определяли с использованием специального анализа ELISA для FIX (AssayPro). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой среднее значение по 3 животным в каждый момент времени (фигура 3). Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В таблице 4 кратко описаны наблюдаемые концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов.

**Таблица 4.** Наблюдаемые концентрации FIX

Время (ч.)	FIX-AD (нг/мл)	FIX-СТР (нг/мл)	FIX-СТР-СТР (нг/мл)
0,083	1506,7	1477,5	1914,8
0,5	1949,8	1150,1	1830,1

1,5	2189,4	1009,0	1264,3
4	733,90	709,33	1000,00
8	319,80	167,20	1234,67
24	НПКО	54,625	230
48	НПКО	НПКО	120,9

[0363] ФК профиль и краткое описание конечных периодов полужизни представлены в таблице 5. У собранного FIX-СТР выявили улучшенные значения  $T_{1/2\beta}$  по сравнению с rhFIX (повышение в 2 и 5 раз, соответственно). Поскольку в серии доз FIX концентрации FIX в сыворотках животных через 24 ч. были ниже предела количественного определения (НПКО), дополнительные ФК параметры не рассчитывали.

**Таблица 5.** Краткое описание ФК параметров

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

[0364] В данном исследовании был описан новый подход к продлению периода полужизни FIX при сохранении его терапевтической эффективности. Присоединение пептида СТР к активному белку потенциально опасно, так как может снижать активность белка. Следовательно, получение активного рекомбинантного FIX-СТР путем добавления последовательности СТР на С-конце FIX является неожиданным.

#### *Исследование FIX-СТР-СТР, очищенного иммуноаффинным способом*

##### **Очистка FIX-СТР-СТР**

[0365] Чтобы оценить белок при высокой степени очистки с повышенной активностью, ФК профиль которого имитирует и может быть экстраполирован на клинические условия, FIX модифицировали 2 молекулами СТР, последовательно присоединенными к карбоксильному концу, с получением FIX-СТР-СТР. FIX-СТР-СТР очищали, применяя связанное с матрицей моноклональное антитело против гамма-карбоксиглутамиловых (Gla) остатков, присутствующих в аминоконцевом участке FIX (American Diagnostics, номер в каталоге 3570MX). Моноклональное антитело было связано с сефарозой CL-4B. Собранный FIX-СТР-СТР при концентрации 88 мкг/мл диализовали против 20 мМ трис, 150 мМ NaCl и 10 мМ ЭДТА при pH =7,4. Скорость загрузки на колонку составляла 0,5

мл/мин, элюирование осуществляли, применяя 20 мМ трис-НСl, 350 мМ NaCl и 50 мМ CaCl, и свободную фракцию вновь подвергали очистке еще пять раз. Наконец, элюированную фракцию диализовали против ФБР, собирали и концентрировали.

[0366] **Определение уровня антигена FIX.** Определяли уровни собранного FIX-СТР, собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub> и очищенного белка FIX-(СТР)<sub>2</sub>, применяя набор для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка (мкг/мл) представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам (фигура 4, таблица 6).

**Таблица 6.** Рассчитанная концентрация белка

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

[0367] Кроме того, осуществляли количественный анализ FIX-СТР-СТР с помощью метода Бредфорд. Рассчитанная концентрация составляла 202 мкг/мл, и она была сходна с концентрацией, выявленной с помощью ELISA FIX человека.

[0368] **Блоты гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН.** Собранный FIX-СТР-СТР, свободную фракцию и очищенный белок загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью окрашивания кумасси осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым голубым (800 нг белка). Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) осуществляли со 100 нг белка, поликлональным антителом (АТ) к FIX человека и моноклональным АТ, узнающим гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499 и #3570). Процедура иммуноаффинной очистки значительно обогатила содержание FIX-СТР-СТР, при этом уменьшив количество примесей (фигура 5).

[0369] **Аминоконцевое секвенирование.** Очищенный белок FIX-СТР-СТР разделяли с помощью ЭФ в 12% трис-глициновом ПААГ/ДСН, а затем осуществляли электроблоттинг (электрофоретический перенос) на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Интересующую полосу вырезали и помещали на очищенный обработанный биобреном (Biobrene) стекловолоконный фильтр. Анализ аминоконцевой последовательности осуществляли путем расщепления по Эдману, применяя импульсный жидкофазный белковый секвенатор, оборудованный микроградиентной системой ВЭЖХ 140 С. Аминоконцевое секвенирование показало, что FIX-СТР-СТР представлял собой смесь

белков с неполностью и полностью отщепленным пропептидом. Было показано, что неполное отщепление пропептида снижает коагулирующую активность FIX. Процесс отщепления пропептида можно улучшить путем котрансфекции фурином.

[0370] **Определение хромогенной активности FIX.** Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* очищенного белка FIX-СТР-СТР по сравнению с rhFIX (American Diagnostics) и объединенной нормальной плазмой человека, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности ВЮРНЕН (Hyphen BioMed 221802). В присутствии тромбина, фосфолипидов и кальция, избыточные количества FXIa активируют FIX в FXa. FXa образует ферментативный комплекс с тромбином (подаваемым в избыточных количествах), фосфолипиды и кальций активируют фактор X, присутствующий в аналитической системе, в FXa. Активность непосредственно коррелирует с количеством FIX, которое представляет собой лимитирующий фактор. Количество полученного FXa измеряли по его удельной активности по отношению к хромогенному субстрату FXa (pNA). Количество образованного pNA прямо пропорционально активности FXa. Готовили серийные разведения rhFIX, плазмы человека и FIX-СТР-СТР, и оценивали эффективность путем сравнения кривых дозовой зависимости (фигура 6). Среднее значение EC<sub>50</sub> для rhFIX составляло 68,74 нг/мл, тогда как рассчитанное для FIX-СТР-СТР EC<sub>50</sub> составляло 505 нг/мл. Наблюдали приблизительно 7-кратное снижение ферментативной активности FIX-СТР-СТР по сравнению с рекомбинантным FIX и 16,5-кратное снижение по сравнению с собранной нормальной плазмой человека. Такую пониженную активность можно объяснить неполным отщеплением аминоконцевого пропептида, которое обнаружили при аминоконцевом анализе.

[0371] **Свертывающая активность FIX (АЧТВ).** Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является мерой целостности внутреннего и общего путей каскада свертывания крови. АЧТВ представляет собой время (измеренное в секундах), которое требуется плазме для свертывания после добавления активатора внутреннего пути, фосфолипида и кальция.

[0372] В данном анализе осуществляли количественное определение способности белка FIX-СТР-СТР восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FIX, путем добавления rhFIX. 300 мкл плазмы человека, обедненной FIX, смешивали с 100 мкл rhFIX, FIX-СТР-СТР (FIX-СТР-СТР (СТР были последовательно присоединены к С-концу)) или объединенной нормальной плазмы человека, и дополнительно разбавляли. После инкубации в течение 60 секунд при 37°C, в смесь добавляли тканевый фактор (TF), CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды. Определяли время свертывания крови в секундах. Эффективность

оценивали путем сравнения кривой дозовой зависимости FIX-СТР-СТР с таковой для эталонного препарата rhFIX или плазмы человека. За одну единицу FIX приняли количество FIX, при котором его активность равна активности 1 мл нормальной плазмы человека.

[0373] Представленные результаты АЧТВ указывают на то, что коагулирующая активность FIX-СТР-СТР лишь в 1,4 меньше, чем у объединенной нормальной плазмы человека, и аналогична rhFIX. Результаты АЧТВ вместе с результатами анализа хромогенной активности *in vitro* позволяют предположить, что очистка FIX-СТР-СТР не нарушала его активность.

[0374] **Фармакокинетическая активность FIX-СТР-СТР.** Очищенный FIX-СТР-СТР, rhFIX (American Diagnostic) и собранные FIX-СТР-СТР и FIX-СТР вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по восемь крыс на вещество) в дозе 100 мкг/кг массы тела (таблица 7).

**Таблица 7.** План проведения ФК исследования

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

[0375] Образцы крови поочередно отбирали из ретроорбитального синуса 4 крыс через 0,083, 0,5, 2, 4, 7, 10, 24, 48 и 72 часа после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Концентрацию FIX определяли, применяя набор для ELISA FIX человека (Affinity Biologics). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль в виде

среднего значения по 4 животным в каждый момент времени (фигура 7). Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В таблице 8 кратко описаны наблюдаемые концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов.

**Таблица 8.** Наблюдаемые концентрации FIX

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

[0376] Краткое описание ФК параметров представлено в таблице 9.

**Таблица 9.** Краткое описание ФК параметров

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

MRT - среднее время удерживания, Vd - объем распределения, CL - клиренс

[0377] Для собранного FIX-СТР-СТР продемонстрировали улучшенный ФК профиль по сравнению с собранным FIX-СТР. Более того, для очищенного FIX-СТР-СТР выявили 3-кратное увеличение значения T<sub>1/2β</sub> и 4,5-кратное увеличение AUC по сравнению с rhFIX.

[0378] Пониженное количество секретированного FIX, слитого с последовательно присоединенными молекулами СТР, по сравнению с FIX, слитым с одним СТР, видимо, является следствием присоединения дополнительного СТР, а не ухудшения детектирования методом ELISA, так как концентрация очищенного FIX-СТР-СТР, рассчитанная методом Бредфорд, была сходна с концентрацией, рассчитанной с помощью ELISA.

[0379] Свертывающая активность FIX-СТР-СТР была близка к активности для объединенной плазмы человека; тем не менее, его хромогенная активность *in vitro* была значительно ниже, чем у rhFIX или объединенной плазмы человека. Анализ хромогенной активности считают очень чувствительным анализом, по сравнению с анализом свертывания крови. Причина пониженной активности FIX-СТР-СТР может быть разной. Добавление СТР может снижать аффинность FIX к FXIa или уменьшать посттранскрипционные модификации (например, 12-10 остатков GLA и отщепление пропептида). Аминоконцевой анализ показал, что протеолитическое отщепление пропептида FIX-СТР-СТР не было полностью завершено перед секрецией. Поскольку данная посттранскрипционная модификация важна для нормальной ферментативной активности белка, котрансфекция плазмидой фурин-РАСЕ полезна и может улучшить активность FIX-СТР-СТР.

[0380] Наконец, сравнительное фармакокинетическое исследование FIX-СТР-СТР на крысах продемонстрировало, что слияние двух последовательно присоединенных СТР с С-концом FIX позволяло получить FIX с увеличенным периодом полужизни.

[0381] **Модель на мышах с дефицитом FIX.** Для того, чтобы оценить активность *in vivo*, получали мышей с нокаутированным геном FIX и создавали размножающуюся линию. 10 мкг либо доступного для приобретения рекомбинантного hFIX (BeneFIX®), либо rFIX-(СТР)<sub>2</sub> (FIX-СТР-СТР) вводили путем инъекции в хвостовую вену мыши после анестезии (массой 22-28 г.) с нокаутированным геном FIX. Количество инъецированного белка было равно необходимой концентрации FIX в нормальной плазме (5 мкг/мл). Образцы крови отбирали из рассеченного хвоста в гепаринизированные капиллярные пробирки в определенные моменты времени. Оценивали уровни FIX в образцах плазмы методом ELISA и измеряли эффективность с использованием анализа АЧТВ на свертывание крови.

[0382] **Повышение эффективности отщепления пропептида FIX.** КДНК пептида СТР соединяли с 3'-концом кДНК FIX человека. Соответствующими конструкциями, экспрессирующими rFIX и фурин, котрансфицировали клетки Dg44; кДНК rFIX человека также котрансфицировали с плазмидой, экспрессирующей фурин, в качестве контроля.

Секретция высокого уровня FIX приводит к секреции смеси профактора и зрелого фактора FIX, вследствие ограниченного количества протеазы фурина в клетке. Котрансфекция вектором, экспрессирующим фурин, с вектором, экспрессирующим профактор, повышает выход и приводит к секреции в среду полностью процессированного FIX.

[0383] После котрансфекции FIX-(СТР)<sub>2</sub> и фурином получали стабильные клоны и собирали их для оценки отщепления пропептида. 100 нг белка загружали на 12% триглицидный гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Осуществляли анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя поликлональные АТ к FIX человека (American Diagnostics) и поликлональное антитело к пропептиду. Ранее сообщали, что rhFIX мигрировал на уровне 55 кДа, тогда как FIX, слитый с двумя СТР, мигрировал на уровне 75 кДа. Показали, что оба варианта белков FIX подверглись правильному полному отщеплению пропептида.

[0384] Для того, чтобы определить, улучшало ли ферментативную активность FIX-(СТР)<sub>2</sub> правильное отщепление пропептида, проводили сравнительную оценку хромогенной и коагулирующей активности собранного FIX-(СТР)<sub>2</sub>, котрансфицированного фурином. Наблюдали существенные улучшения удельной активности FIX-(СТР)<sub>2</sub>, которая была сходна с таковой для rhFIX.

[0385] В заключение, результаты, описанные в настоящем тексте, позволяют предположить, что FIX-СТР-СТР можно эффективно применять для лечения пациентов с гемофилией В. FIX, слитый с конструкциями СТР, полезен благодаря улучшенным фармакологическим свойствам *in vivo*, которые компенсируют недостатки некоторых показателей *in vitro*. Данное предложенное лечение обладает преимуществом над известными способами лечения, так как оно позволяет уменьшить частоту инфузий и необходимое количество доз.

[0386] Стоит отметить, что когда для увеличения периода полужизни FIX применяли стратегию присоединения молекулы альбумина, рекомбинантный FIX становился неактивным. Предложенный новый подход обеспечил создание и очистку нового рекомбинантного FIX-слитого белка, который проявил улучшенную длительную активность. Поскольку сами по себе модификации не улучшали фармакокинетику вводимого путем инъекции FIX, обнаружение того, что СТР, слитый с FIX, улучшает фармакокинетические параметры, было неожиданным. Присутствие высокогликозилированного пептида-остатков сиаловой кислоты стабилизировало белок и защищало его от взаимодействий с сосудистыми рецепторами, не нарушая ключевые факторы, определяющие функционирование FIX.

[0387] FIX-СТР обладает терапевтической эффективностью, близкой к эффективности у rFIX, у пациентов с гемофилией В и требует менее частого введения. Однократной инъекции FIX-СТР достаточно, чтобы контролировать эпизоды кровотечения и уменьшить количество инъекций, которые необходимы во время хирургического вмешательства у пациентов с гемофилией В.

[0388] Для разработки FIX пролонгированного действия применяли технологию СТР. В частности, продление периода полужизни рекомбинантной молекулы rFIX осуществляли путем слияния по меньшей мере одного СТР человека с FIX. Рекомбинантный белок FIX-СТР экспрессировали в клетках млекопитающих и подвергали анализу *in vitro* и *in vivo*. Продemonстрировали, что активность rFIX-СТР *in vitro* была сравнима с rFIX. Исследования фармакокинетики и эффективности у крыс продемонстрировали улучшенные свойства rFIX-СТР. Результаты данного исследования продемонстрировали, что разработка молекулы rFIX с продленным периодом полужизни, обладающей кровоостанавливающими свойствами, близкими с таковыми у фермента дикого типа, практически осуществима.

## **ПРИМЕР 2**

### ***Сравнительная оценка очищенного FIX-СТР<sub>3</sub> против FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>***

[0389] **2.1 Цель исследования.**

[0390] Сравнительная оценка фармакокинетических параметров FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub> после процесса частичной очистки.

[0391] **2.2 Получение собранных FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>.**

[0392] КДНК FIX (OriGene RC219065), слитую на С-конце с четырьмя или пятью последовательно присоединенными последовательностями СТР, экспрессировали в клетках Dg44, применяя систему экспрессии Excellgene, в присутствии 10 нг/л витамина К3 (Sigma, Mennadion). Кондиционированные среды собирали (300 мл), фильтровали и замораживали.

[0393] **2.3 Получение собранного FIX-СТР<sub>3</sub>.**

[0394] FIX-СТР<sub>3</sub> экспрессировали внутри хозяина в клетках CHO, применяя вектор pCI-DHFR, клон 196, BR-9 в присутствии 25 нг/л витамина К3 (Sigma). Полученные суспензии клеток собирали и фильтровали.

[0395] Все образцы FIX-СТР (3, 4 и 5 СТР) очищали только на колонке Якалин, вследствие нехватки материала.

[0396] **2.4 Определение уровня антигена FIX.**

[0397] Уровень антигена FIX определяли с помощью набора для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по четырем независимым экспериментам. Концентрация FIX-СТР<sub>3</sub> была немного выше по сравнению с двумя дополнительными вариантами (таблица 10).

**Таблица 10.** Уровень антигена FIX

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

[0398] **2.5 Окрашивание кумасси и иммуноблоттинг FIX-СТР.**

[0399] Собранные FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли методом вестерн-блотт(иммуноблоттинга), применяя поликлональные АТ к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к GlA (American Diagnostica).

[0400] Как сообщалось ранее, FIX, слитый с тремя СТР, мигрировал на уровне 80 кДа, тогда как FIX, слитый с четырьмя или пятью СТР, мигрировал на уровне 85 кДа или 90 кДа, соответственно. Как и ожидалось, у собранных FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>, полученных от Excellgene, выявили очень низкие уровни гамма-карбоксихлорирования по сравнению с собранным FIX-СТР<sub>3</sub>, который получили от Prolor (фигура 8).

[0401] После процесса очистки с применением колонки с якалином (иммуноаффинной очистки гликозилированных белков), FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Гели после ЭФ в ПААГ/ДСН окрашивали красителем кумасси бриллиантовым голубым для обнаружения образцов. У всех вариантов выявили гораздо более «чистые» профили полос (фигура 9), что позволяет предложить повышение чистоты белков.

[0402] **2.6 Определение хромогенной активности FIX.**

[0403] Сравнительную оценку активности *in vitro* полностью очищенных (на ГА-колонке) FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной

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

**Таблица 11.** Отношение EC50 образец/плазма

Образец	Отношение EC50 образец/плазма
Плазма	1
3 СТР, конечный, ГА	2
4 СТР, конечный, ГА	5,35
5 СТР, конечный, ГА	2,73

[0404] **2.7 Фармакокинетическое исследование.**

[0405] Очищенные на колонке с Якалином FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub> (группы А, В и С, соответственно) вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на группу лечения) в дозе 250 мкг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5 2, 5, 8, 24, 48, 72 и 96 часов после введения (таблица 12). Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

**Таблица 12.** План проведения ФК исследования

Группа лечения	Лечение	Количество животных/ группу	Путь введения	Уровень дозы (мкг на	Инъекцир ованный объем	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (ч. после введения)
я			ия	на			

				животно е)	(мкл)		
А	FIX- СТР*3 Якалин 40	6	в/в	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
В	FIX- СТР*4 Якалин 40	6	в/в	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
С	FIX- СТР*5 Якалин 40	6	в/в	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

[0406] Осуществляли количественный анализ концентрации FIX в образцах плазмы, применяя наборы для Elisa FIX человека (Affinity Biologics). Рассчитывали фармакокинетический профиль, который представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени. Конечный период полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В таблице 13 ниже кратко описаны рассчитанные концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов.

**Таблица 13.** Рассчитанные концентрации FIX

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

[0407] ФК профиль и краткое описание ФК параметров представлены ниже в таблице 14 и на Фигуре 11. Полный профиль ФК-анализа во все моменты времени позволил

предположить, что добавление к FIX 4 или 5 кассет СТР не увеличило период полужизни по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub>. AUC после введения FIX-СТР<sub>5</sub> увеличилась в 1,4 - 1,6 раз по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub>, но это увеличение не было статистически значимым.

**Таблица 14.** ФК профиль и краткое описание ФК параметров

<b>24 - 96 ч.</b>	<b>3 СТР</b>	<b>4 СТР</b>	<b>5 СТР</b>
<b>Период полужизни (ч.)</b>	20,43	22,02	23,96
<b>AUC (нг/ч/мл)</b>	8218,38	10504,49	13329,41
<b>Vd (мл/кг)</b>	700,76	586,02	494,89
<b>CL (мл/ч/кг)</b>	23,77	18,45	14,32

[0408] Поскольку в образцах, полученных через 96 ч. после введения, обнаружили очень низкие концентрации FIX, которые были на нижнем пределе количественного обнаружения анализа, конечный период полужизни рассчитали заново, осуществляя более точный и научно обоснованный расчет (таблица 15). Согласно данному расчету, получили даже самые малые различия между периодами полужизни FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>.

**Таблица 15.** Рассчитанный заново конечный период полужизни

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

[0409] **2.8 Выводы.**

[0410] В данном исследовании оценивали фармакокинетические параметры и потенциальную свертывающую активность FIX-СТР<sub>3</sub>, FIX-СТР<sub>4</sub> и FIX-СТР<sub>5</sub>. Слияние 4 и 5 СТР с FIX не обеспечивало улучшение или продление периода полужизни, по сравнению с FIX-СТР<sub>3</sub>, и наблюдалось снижение хромогенной активности. В таблице 16 ниже кратко описаны процентные улучшения периода полужизни для различных слитых вариантов FIX-СТР (от 1 до 5 СТР). Слияние СТР с FIX улучшало его фармакокинетические свойства, но, непредвиденно, данное улучшение было ограниченным. Неожиданно, после последовательного присоединения 3, 4 или 5 СТР к FIX, были рассчитаны аналогичные значения периодов полужизни.

**Таблица 16.** Краткое описание процентного улучшения периода полужизни

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

[0411] Полученные результаты позволяют предположить, что слияние 3 СТР с FIX вызывало максимальное улучшение периода полужизни белка, подтверждая, что FIX-СТР<sub>3</sub> представляет собой оптимальный вариант с точки зрения периода полужизни, структуры и потенциальной свертывающей активности для дальнейшей клинической разработки.

### ПРИМЕР 3

#### **ЛЕЧЕНИЕ FIX-СТР<sub>3</sub> НА ПРИМЕРЕ FIX-/- ГЕМОФИЛЬНОЙ МОДЕЛИ НА МЫШАХ**

[0412] Как описано выше, проводили исследование, в котором тестировали ФК профиль и коагулирующую активность собранных FIX-СТР, FIX-СТР<sub>2</sub> и FIX-СТР<sub>3</sub> по сравнению с rhFIX. FIX-СТР<sub>3</sub> проявил улучшенный ФК профиль, при этом сохранив коагулирующую активность, по сравнению с собранными FIX-СТР<sub>1</sub> и FIX-СТР<sub>2</sub> или rhFIX. Для того, чтобы дополнительно оценить полученный результат, очищали белок FIX-СТР<sub>3</sub> с остатками гамма-карбоксиглутамата. После однократного в/в введения FIX-СТР<sub>3</sub> нормальным крысам выявили 3-кратное увеличение периода полужизни и 4,5-кратное увеличение AUC по сравнению с rhFIX. Для FIX-СТР<sub>3</sub> продемонстрировали пониженную хромогенную и свертывающую активность *in vitro*, наиболее вероятно вследствие недостаточного отщепления аминоконцевого пропептида и неподходящих посттранскрипционных модификаций (ПТМ), таких как неподходящее гамма-карбоксилирование.

[0413] В настоящем исследовании изучали фармакокинетические и фармакодинамические свойства рекомбинантного FIX человека, слитого с тремя последовательно присоединенными СТР, у мышей, лишенных FIX.

[0414] **Цель исследования.**

[0415] Определить фармакокинетические и фармакодинамические параметры rFIX-(СТР)<sub>3</sub> по сравнению с доступным для приобретения rhFIX (BeneFIX®) у мышей, лишенных FIX, после однократного в/в введения FIX-(СТР)<sub>3</sub> при аналогичной удельной активности и дозе (аналогичной удельной активности для ФД и аналогичных параметрах FIX для ФК).

[0416] **Получение собранного FIX-СТР<sub>3</sub>.**

[0417] КДНК FIX (OriGene RC219065-Thr 148), к С-концу которой последовательно присоединены три последовательности СТР, экспрессировали в клетках Dg44, применяя систему экспрессии Excellgene, в присутствии 25 нг/мл витамина К3 (Sigma, Mennadion). Пять отдельных партий, содержащих по 5 литров суспензии клеток, культивировали (всего двадцать пять литров) и собирали после снижения жизнеспособности до 60-70%. Собранные суспензии фильтровали и замораживали при -70°C.

[0418] **Определение уровня собранного антигена FIX.**

[0419] Уровень собранного антигена FIX определяли с помощью набора для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Уровень антигена рассчитывали для каждой партии. Концентрация FIX сохранялась среди различных партий (таблица 17).

**Таблица 17. Уровень антигена FIX**

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

[0420] **Процесс очистки FIX-СТР<sub>3</sub>.**

[0421] После короткого исследования очистки осуществляли процесс очистки, применяя следующие 3 колонки: диэтиламиноэтанол (ДЭАЭ)-сефароза, гепарин-сефароза и керамический гидроксипатит (ГА) 1 типа Bio Rad (40 мкм). Очищали обогащенный гамма-карбокситированный белок FIX-СТР<sub>3</sub>. Вкратце: пять литров осветленной собранной суспензии клеток размораживали при 4°C в течение 4 дней. Для каждой партии очистки, осветленную собранную суспензию клеток (2 литра) концентрировали в 4 раза и диализовали против 20 мМ трис-НСl рН 8,2, применяя одноразовый картридж из полого волокна с номинальной отсечкой по молекулярной массе 10 кДа. Данный процесс (УФ-ДФ1) осуществляли дважды, один литр УФ-ДФ1 загружали на колонку с ДЭАЭ-сефарозой, и фактор IX элюировали 20 мМ трис-НСl, 200 мМ NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 8,2. Полученный продукт разбавляли 1:1 20 мМ трис-НСl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5, и рН подводили до 7,5 перед загрузкой на колонку с гепарин-сефарозой. Элюирование осуществляли 20 мМ трис-НСl, 300 мМ NaCl и 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5. Элюированный продукт концентрировали и диализовали против 10 мМ фосфата, рН 6,8, применяя кассету Pellicon XL с мембраной с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (УФ-ДФ2). Полученный продукт загружали на ГА-колонку и активированную фракцию фактора IX элюировали 150 мМ фосфатом, рН 6,8. Очищенный продукт концентрировали до целевой

концентрации, равной 2 мг/мл, диализовали против трис-буферного раствора (TBS), pH 7,45, разделяли на аликвоты и хранили при -70°C.

[0422] Процесс очистки повторяли пять раз, еженедельно, чтобы очистить весь объем (25 литров). Процессы очистки назвали ГА№ 6-10. Каждый очищенный продукт оценивали отдельно (прил. № 1-5). По окончании процесса очистки, различные партии объединяли и дополнительно концентрировали до целевой концентрации, равной 4 мг/мл.

[0423] **Аналитические свойства FIX-СТР<sub>3</sub>.**

[0424] Определение уровня антигена FIX

[0425] Антигенный уровень обогащенного гамма-карбоксилированного белка FIX-СТР<sub>3</sub> определяли с применением набора для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам (таблица 18).

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

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

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

Сред. (мг/мл)	3,895684	4,069618	3,982651	Сред. (мг/мл)	3,773484	3,594708	3,684096	3,833373
------------------	----------	----------	----------	------------------	----------	----------	----------	----------

[0426] Блоты гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН.

[0427] Обогащенный гамма-карбоксилированный белок FIX-СТР<sub>3</sub>, rhFIX и rFIXa (активированный FIX) загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ с помощью окрашивания кумасси геля после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым голубым (800 нг белка) (фигура 12). Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) осуществляли, применяя 100 нг белка, с помощью поликлональных АТ к FIX человека (фигура 12B), моноклонального антитела, узнающего гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499, 3570) (фигура 12C), поликлональных АТ к пропептиду FIX (фигура 12D) и поликлональных АТ к СТР (фигура 12E). Ранее сообщали, что FIX-СТР<sub>3</sub> мигрировал на уровне 75 кДа.

[0428] Процедура очистки значительно обогатила содержание FIX-СТР<sub>3</sub>, при этом уменьшив количество примесей. Выход процесса очистки был очень низким и находился в диапазоне около 2-3% (результаты не представлены) вследствие необходимости сбора только гамма-карбоксилированных фракций FIX-СТР<sub>3</sub>, что продемонстрировано на иммуноблоте, окрашенном антителами к Gla (фигура 12B). На основании окрашивания кумасси и иммуноблоттинга FIX выявили, что FIX-СТР<sub>3</sub> составлял лишь приблизительно 60-70%, также были обнаружены дополнительные полосы с меньшей молекулярной массой, предположительно, менее гликозилированные формы.

[0429] **Свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub>.**

[0430] Хромогенная активность FIX-СТР<sub>3</sub>.

[0431] Осуществляли сравнительную оценку активности *in vitro* собранного FIX-СТР<sub>3</sub> и обогащенного гамма-карбоксилированного белка FIX-СТР<sub>3</sub>, по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Готовили серийные разведения собранного FIX-СТР<sub>3</sub> и очищенного белка FIX-СТР<sub>3</sub> и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарственного средства, состоящего из нормальной плазмы человека. Ранее продемонстрировали, что собранный FIX-СТР<sub>3</sub> был в 50 раз менее активным, чем объединенная плазма человека (таблица 19, фигура 13). После очистки FIX-СТР<sub>3</sub>,

хромогенная активность значительно улучшилась и была лишь в 4,72 раза меньше, чем активность объединенной плазмы человека (таблица 19, фигура 13). Снижение хромогенной активности собранного FIX может быть следствием неправильных посттранскрипционных модификаций вариантов белка FIX, например, неподходящего гамма-карбоксилирования и отщепления пропептида. После очистки и обогащения гамма-карбоксилированной фракцией FIX-СТР<sub>3</sub>, активность улучшилась, демонстрируя существенный вклад гамма-карбоксилирования в активность FIX.

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

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

[0432] Одностадийный анализ свертывания крови (АЧТВ).

[0433] Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является мерой целостности внутреннего и общего путей каскада свертывания крови. АЧТВ представляет собой время в секундах свертывания плазмы после добавления активатора внутреннего пути, фосфолипида и кальция. Основной целью данного анализа является количественное определение способности FIX-СТР<sub>3</sub> восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FIX, при добавлении rhFIX. 200 мкл плазмы человека, обедненной FIX, смешивали с 25 мкг/мл FIX-СТР<sub>3</sub> и дополнительно разбавляли в TBS. После инкубации в течение 60 секунд при 37°C, в смесь добавляли 50 мкл активатора ЧТВ (Actin FS) и 50 мкл 25 мМ кальция, и определяли время свертывания крови в секундах с применением коагулометра Sysmex® CA 1500 (выполняли в больнице Шибы, в Национальном центре свертывания крови, применяя утвержденный анализ АЧТВ). Оценивали эффективность путем сравнения FIX-СТР<sub>3</sub> с кривой дозовой зависимости эталонного препарата объединенной нормальной плазмы человека. Результаты выражали в виде процента активности, интерполированного по стандартной кривой, покрывающей уровни FIX <1 - 110%. Выявили 15-20-кратное снижение коагулирующей активности FIX-СТР<sub>3</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, поскольку было

показано, что активность при концентрации 5 мкг/мл, которая является нормальной концентрацией FIX в организме, составила 6,5% (таблица 20).

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

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

[0434] FIX-СТР<sub>3</sub> также проявил повышенное время свертывания крови по сравнению с BeneFIX® (таблица 21 и фигура 14).

**Таблица 21.** Сравнительное время свертывания крови (АЧТВ)

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

[0435] Дополнительный анализ свертывания крови был проведен независимо на мышах с дефицитом FIX доктором Paul Monahan в Университете Северной Каролины перед началом исследования ФК-ФД. Результаты анализа АЧТВ позволили предположить, что коагулирующая активность FIX-СТР<sub>3</sub> была в 40 раз меньше, чем таковая у объединенной нормальной плазмы человека, что продемонстрировали необходимостью более длительного периода (измеренного в секундах) и более высокой концентрации для достаточной свертывающей активности (таблица 22).

**Таблица 22.** Сравнительная свертывающая активность

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

[0436] Удельная активность (ед./мл), которую рассчитывали на основании уровня антигена FIX, что рассчитывали с помощью ELISA для FIX-СТР<sub>3</sub> и BeneFIX®, составляла 4,46 и 198,9 соответственно.

[0437] Несоответствие рассчитанной активности FIX-СТР<sub>3</sub>, продемонстрированной в хромогенном анализе по сравнению с анализом АЧТВ можно объяснить повышенной чувствительностью анализа АЧТВ и значимостью анализа *in vivo*. В анализе хромогенной активности, присутствует избыточное количество реагентов и ферментов, которые могут активировать менее эффективные варианты FIX. Различие в значениях удельной активности FIX-СТР можно объяснить применением различных реагентов и автоматизированных устройств. Значение активности, рассчитанное в Университете Северной Каролины, использовали для дизайна исследования ФК-ФД.

#### **Детектирование белка FIXa.**

[0438] Чтобы подтвердить, что после процесса очистки активация FIX (FIXa) не произошла, осуществляли анализ детектирования FIXa, применяя хромогенный анализ FIXa Biophen (номер в каталоге 221812). В данном анализе измеряют количество FIXa, присутствующего в конкретном образце, применяя каскад хромогенной активности, описанный ранее. FIX-СТР<sub>3</sub> и rhFIX разбавляли и оценивали уровни FIXa. FIX-СТР<sub>3</sub> не активировался в процессе очистки или хранения (таблица 23).

**Таблица 23.** Детектирование FIXa

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

## образце

[0439] **Исследование ФК-ФД FIX-СТР<sub>3</sub>.** FIX-СТР<sub>3</sub> и rhFIX (BeneFIX®) вводили однократной внутривенной инъекцией мышам C57Bl, лишенным FIX, в дозе 625 мкг/кг массы тела, содержащей 100 МЕ FIX/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 мышей поочередно через 0,25, 4, 24, 48, 72 и 96 часов после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Оценивали уровень антигена hFIX, и осуществляли тщательный ФК-анализ. Чтобы оценить способность FIX-СТР<sub>3</sub> продвигать свертывающую активность у животных, лишенных FIX, по сравнению с BeneFIX®, рассчитывали активность FIX в образцах цитратной плазмы, собранных у мышей FIX<sup>-/-</sup>, подвергнутых лечению, применяя автоматизированный анализ активности FIX (таблица 24).

Таблица 24. Схема исследования

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

\* Только точки сбора результатов ФК

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

[0440] Фармакокинетический профиль FIX-СТР<sub>3</sub> у мышей FIX<sup>-/-</sup>

[0441] Концентрацию FIX рассчитывали, применяя наборы для ELISA FIX человека (Affinity Biologics; номер в каталоге FIX-AG RUO). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по трем

животным в каждый момент времени. Ниже в таблице 25 и на фигуре 15 кратко описаны рассчитанные концентрации FIX в различные моменты времени взятия образцов для групп 1 и 3. ФК профиль и краткое описание ФК параметров представлены ниже (таблицы 26 и 27). Анализ ФК также осуществляли для группы №2, чтобы проверить воздействие (результаты не представлены).

**Таблица 25.** Концентрации FIX

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

[0442] Двухкомпарментный модуль (программного обеспечения WinLin) применяли для определения AUC<sub>0-бесконеч.</sub>, T<sub>конеч.</sub> и клиренса (CL). ФК параметры описаны ниже в таблице 26.

**Таблица 26.** ФК свойства

<b>Вариант FIX</b>	<b>T<sub>1/2α</sub> (1/ч.)</b>	<b>T<sub>1/2β</sub> (1/ч.)</b>	<b>AUC нг/мл*ч.</b>	<b>CL мл/кг/ч.</b>	<b>MRT (ч.)</b>	<b>V<sub>ss</sub> (мл/кг)</b>
<b>BeneFIX®</b>	3,4	12,7	22428	29	11,5	320,8
<b>FIX-СТР<sub>3</sub></b>	4	28,7	31770	19	22	425,2

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

[0443] Добавление трех “кассет” СТР к rhFIX удлиняло период полужизни FIX *in vivo* по меньшей мере в 2,5 раза. AUC после введения FIX-СТР<sub>3</sub> *in vivo* возрастала в 2 раза по сравнению с введением rhFIX. У мышей, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, продемонстрировали улучшенный ФК профиль по сравнению с мышами, которым вводили BeneFIX®.

[0444] Фармакодинамический профиль FIX-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FIX

[0445] Параллельно с взятием образцов на ФК, у образцов цитратной плазмы животных, лишенных FIX, которым вводили либо BeneFIX®, либо FIX-СТР<sub>3</sub>, оценивали свертывающую активность с помощью анализа АЧТВ, результаты которого преобразовывали в % активности. % активности в каждый момент сбора рассчитывали как текущее время свертывания/время свертывания объединенной нормальной плазмы мыши\*100. В таблице 27 кратко описаны значения активности после введения либо BeneFIX®, либо FIX-СТР<sub>3</sub>.

[0446] После введения FIX-СТР<sub>3</sub>, значительная свертывающая активность была обнаружена через один час после введения, достигая активности 96% через четыре часа после введения, тогда как наивысшее значение активности BeneFIX® составляло 40% (таблица 27, фигура 16). Свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub> поддерживалась в течение более продолжительного периода времени, демонстрируя продленную активность. Свертывающая активность у мышей, которых лечили BeneFIX®, не детектировалась в моменты времени после 36 часов, тогда как у мышей, которых лечили FIX-СТР<sub>3</sub>, продолжала сохраняться измеримая активность через 72 часа после введения (таблица 27, фигура 16). Анализ фармакокинетического профиля % свертывания позволяет предположить, что свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub> сохраняется в течение значительно более продолжительного периода времени, и его период полужизни почти в 2 раза выше, чем у BeneFIX® (таблица 28).

**Таблица 27. % активности FIX**

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

**Таблица 28. Свертывающая активность**

<b>Вариант FIX</b>	<b>T<sub>1/2</sub><math>\alpha</math> (1/ч.)</b>	<b>T<sub>1/2</sub><math>\beta</math> (1/ч.)</b>
<b>BeneFIX®</b>	5,7	-----
<b>FIX-СТР<sub>3</sub></b>	7,3	16

[0447] Тест на кровотечение у мышей, лишенных FIX

[0448] Мышам с дефицитом FIX, вводили однократную внутривенную инъекцию 100 МЕ/кг BeneFIX® или rFIX-СТР<sub>3</sub>. Хвостовую вену слегка рассекали через 48 часов после введения, и оценивали время кровотечения из хвостовой вены (ВКХВ) и интенсивность кровотечения (О.П. гемоглобина). Второй тест в кровотечением проводили через 15 минут после достижения гомеостаза, и измеряли те же параметры. После первого теста с кровотечением, кровотечение у животных, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, было значительно менее интенсивным, чем кровотечение у животных, которым вводили BeneFIX®, что продемонстрировали с помощью значений О.П. гемоглобина (фигура 17).

[0449] Поскольку ранее было описано, что в процессе первого теста с кровотечением у мышей с гемофилией, время кровотечения не обязательно коррелирует с эффективностью лечения, рекомендуется оценить гомеостаз после дополнительного кровотечения. Как только первое кровотечение остановилось самопроизвольно или было остановлено вручную, осуществляли второе тест с кровотечением через 15 минут после первого, и заново измеряли время и интенсивность кровотечения. Во время второго эпизода кровотечения у животных, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, время и интенсивность кровотечения были меньше, демонстрируя что FIX-СТР<sub>3</sub> был эффективен в более поздние моменты времени (фигура 18).

[0450] Наконец, за животными далее наблюдали в течение 12 часов после второго теста с кровотечением, и все повторения эпизодов кровотечения были зафиксированы. Животные, которым вводили FIX-СТР<sub>3</sub>, оказались способны поддерживать гомеостаз крови в течение следующих 12 часов, без повторения эпизодов кровотечения. Наоборот, у 50% мышей, которых лечили BeneFIX®, наблюдались спонтанные эпизоды кровотечения из хвоста (таблица 29).

**Таблица 29.** Результат через 12 часов после рассечения хвоста

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

[0451] Рекомбинантный FIX-СТР<sub>3</sub>, слитый белок, состоящий из одной молекулы FIX, слитой с последовательно присоединенными тремя "кассетами" СТР, разработали, чтобы решить проблему короткого периода полужизни доступных на сегодняшний день продуктов FIX, применяемых для лечения пациентов с гемофилией В. Мы продемонстрировали, что период полужизни rFIX-СТР<sub>3</sub> был стабильно в 2,5 – 4 раза больше, чем для rFIX у крыс (как сообщали ранее) и у мышей, лишенных FIX.

[0452] Без привязки к какой-либо конкретной теории, слитый белок уменьшал клиренс FIX и защищал FIX от активности протеаз, деградации благодаря маскированию и уменьшал аффинность FIX к рецепторам печени. В совокупности данные свойства домена СТР увеличивают период полужизни FIX.

[0453] В дополнение к фармакокинетическому анализу rFIX-СТР<sub>3</sub> мы исследовали фармакодинамические свойства FIX-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FIX. rFIX-СТР<sub>3</sub> и rFIX вводили в сопоставимых дозах (в единицах), чтобы компенсировать недостаточность свертывания крови уровни у мышей, лишенных FIX. Тем не менее, действие rFIX-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FIX, значительно увеличивалось, до по меньшей мере 76 ч. после введения, достигая более высокого пика активности. Свертывающая активность FIX-СТР<sub>3</sub> начала проявляться с задержкой в 1 час по сравнению с BeneFIX®. Активация FIX может быть необходима, поскольку добавление трех последовательно присоединенных СТР теоретически может маскировать сайт активации и задерживать начало каскада. После введения FIX-СТР<sub>3</sub>, наблюдали пик 100% активности, тогда как активность BeneFIX® составляла лишь 40%. Более высокая исходная активность является очень важным параметром, было продемонстрировано, что добавление 3 СТР потенциально может улучшить выход.

[0454] Целью профилактической заместительной терапии FIX пациентов с гемофилией В является поддержание в плазме 1–2% уровня нормальной свертывающей активности. Анализ кровотечения из хвостовой вены представляет собой чувствительный тест *in vivo*, позволяющий измерить способность поддержания гомеостаза свертывания крови при низких значениях активности, имитируя модель гомеостаза свертывания крови у человека. В ответ на тест с кровотечением из хвостовой вены через 48 часов после введения, у животных, которым вводили rFIX-СТР<sub>3</sub>, поддерживался гомеостаз свертывания крови с более короткими и менее тяжелыми эпизодами кровотечения, демонстрируя продленную свертывающую активность.

[0455] FIX представляет собой сложный белок, который содержит множество функциональных доменов, которые подвергаются большому количеству посттрансляционных модификаций. Одна из необходимых для активности FIX

посттрансляционных модификаций представляет собой гамма-карбоксилирование первых 12 глутаминовых кислот в домене Gla зависимой от витамина К гамма-глутамилкарбоксилазой. Данная модификация способствует связыванию FIX с фосфолипидными мембранами и, таким образом, важна для его функционирования. FIX, который не гамма-карбоксилирован, не функционален, и, следовательно, гамма-карбоксилирование представляет собой стадию, лимитирующую скорость реакции.

[0456] Данное исследование ФК-ФД осуществляли, применяя временно трансфицированные клетки. Обширную аналитическую оценку посттрансляционных модификаций выполняли на стабильном белке FIX-СТР<sub>3</sub>, продуцированном и секретированном стабильным оптимизированным клоном.

[0457] На основании представленных результатов фактор свертывания крови FIX-СТР<sub>3</sub> потенциально может уменьшить частоту инъекций пациентам, получающим рутинные профилактические дозы FIX-заместительной терапии. Ожидается, что rFIX-СТР<sub>3</sub> может обеспечивать пролонгированную защиту от кровотечения после каждого введения фактора, уменьшать общее количество единиц фактора, необходимых для лечения эпизодов кровотечения, и/или сохранять достаточный гемостаз при проведении хирургических процедур после меньшего количества инъекций.

#### **ПРИМЕР 4**

##### ***Получение и применение фактора свертывания крови FVII***

[0458] Версия активированного фактора свертывания крови VII (FVIIa) пролонгированного действия будет полезна для лечения пациентов с гемофилией А и В. Рекомбинантный белок FVIIa-СТР<sub>3</sub> обладает клиническим потенциалом для улучшения лечения пациентов с гемофилией путем уменьшения частоты инфузий и даже путем уменьшения нагрузки лекарственного средства, делая возможным подход профилактического лечения, который может значительно улучшить качество жизни пациента, избежать спонтанных эпизодов кровотечения и накопления повреждения суставов и других органов.

[0459] В настоящем тексте описано получение рекомбинантной молекулы FVIIa-СТР с продленным периодом полужизни, основанное на слиянии FVII с СТР человека. Рекомбинантный FVIIa-СТР экспрессировали в клетках млекопитающих и охарактеризовали *in vitro* и *in vivo*. Продемонстрировали, что активность rFVII-СТР была сравнима с rFVII. Исследования фармакокинетики и эффективности у крыс продемонстрировали улучшенные свойства rFVII-СТР. Результаты данного исследования продемонстрировали, что разработка молекулы rFVIIa с продленным периодом

полу жизни и с кровоостанавливающими свойствами, очень близкими ферменту дикого типа, практически осуществима.

[0460] **Клонирование и экспрессия рекомбинантной молекулы FVII.** Сконструировали несколько клонов фактора VII в нашем эукариотическом векторе экспрессии (pCI-dhfr) (фигура 19). Проверенный MGC клон кДНК FL человека (IRCM), включающий последовательность фактора свертывания крови VII *homo sapiens*, заказали в “Open Biosystems” (OB-MHS4426). Следующие праймеры были синтезированы в Sigma-Genosys со следующими последовательностями: праймер 67: 5'CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCC3' (включает 5'-конец ДНК фактора VII и сайт рестрикции XhoI) (SEQ ID NO: 5); праймер 68<sup>R</sup>: 5'TCTAGAATAGGTATTTTCCACATG3' (включает сайт рестрикции XbaI) (SEQ ID NO: 6); праймер 69: 5'TCTAGAAAAAAGAAATGCCAGC3' (включает сайт рестрикции XbaI) (SEQ ID NO: 7); и праймер 70<sup>R</sup>: 5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAAATGGGGCTCGCA3' (включает 3'-конец ДНК фактора VII и сайт рестрикции NotI) (SEQ ID NO: 8).

[0461] Клонирование осуществляли двумя сериями реакций ПЦР. Первую реакцию осуществляли с праймером 67 и праймером 68<sup>R</sup>, используя плазмиду кДНК с последовательностью фактора VII (OB-MHS4426) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР получили продукт ~534 п.о., выделили его и лигировали в клонирующий вектор TA (Invitrogen, номер в каталоге: K2000-01). Выделили фрагмент XhoI –XbaI, включающий последовательность N-конца фактора VII. Вторую реакцию осуществляли с праймером 69 и праймером 70<sup>R</sup>, и снова плазмиду кДНК с последовательностью фактора VII (OB-MHS4426) использовали в качестве матрицы. В результате амплификации ПЦР получили продукт ~813 п.о. и лигировали его в клонирующий вектор TA (Invitrogen, номер в каталоге: K2000-01). Выделили фрагмент XbaI-NotI, включающий последовательность карбоксильного конца фактора VII. Полученные два фрагмента встраивали в наш эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr (тройное лигирование) с получением клона 501-0-p136-1.

[0462] Плазмиду 501-p136-1 (фактор VII в векторе pCI-dhfr) расщепляли ферментами рестрикции XhoI и KpnI. Выделяли фрагмент размером ~1186 п.о. Частичный клон фактора VII (1180 п.о. -1322 п.о.), за которым следовала последовательность СТР, терминирующая последовательность и последовательность NotI, который синтезировали в GeneArt (0721543), расщепляли ферментами рестрикции KpnI и NotI. Выделяли фрагмент размером ~253 п.о. Полученные два фрагмента встраивали в наш эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr (тройное лигирование) с получением клона 501-1-p137-2. pCI-dhfr-

701-2-p24-2 расщепляли ферментами рестрикции XhoI и ApaI и выделяли большой фрагмент (вектор).

[0463] pCI-dhfr-501-2-p137-2 (фактор VII-стр x1) расщепляли ферментами рестрикции XhoI и ApaI и выделяли вставку размером ~1200 п.о. Вектор и вставку лигировали с получением 501-2-p139-2. Клетки Dg44 высевали на чашки для культивирования клеток размером 100 мм и растили до конфлюентности 50-60%. Всего 2 мкг ДНК использовали для трансфекции одной 100 мм чашки, применяя реагент FuGene (Roche) в безбелковой среде (Invitrogen CD Dg44). Среду удаляли через 48 часов после трансфекции и заменяли на безбелковую среду (Invitrogen CD Dg44) без нуклеозидов. Через 14 дней, популяцию трансфицированных клеток переносили во флаконы для культивирования клеток T25, и селекцию продолжали в течение 10-14 дней до тех пор, пока клетки не начали хорошо расти как стабильные клоны. Выбирали клоны с высоким уровнем экспрессии и приблизительно  $2 \times 10^7$  клеток использовали для инокуляции 300 мл ростовой среды, в роллерной бутылки 1700 см<sup>2</sup> (Corning, Корнинг, Нью-Йорк), дополненной 5 нг/мл витамина К3 (менадиона натрия бисульфата; Sigma). Кондиционированную среду собирали после быстрого снижения жизнеспособности клеток до приблизительно 70%. Кондиционированную среду сначала осветляли, а затем концентрировали приблизительно в 20 раз и диализовали против ФБР, применяя проточную фильтрационную кассету (с отсеккой по молекулярной массе 10 кДа; Millipore Corp, Биллерика, Массачусетс).

[0464] **Определение уровня антигена FVII.**

[0465] КДНК, кодирующую пептид СТР, соединяли с 3'-концом кДНК, кодирующей FVII человека. Соответствующей конструкцией rFVII трансфицировали клетки Dg44. В качестве контроля использовали кДНК rFVII человека. Кондиционированную среду собирали, концентрировали, и далее оценивали секретированный рекомбинантный FVII. Уровни антигенов rFVII, rFVII-СТР и rFVII-СТР-СТР определяли с помощью набора для ELISA FVII человека AssayMax (AssayPro) (фигура 20А). Не наблюдали значимого различия в уровне секреции rFVII-СТР и rFVII-(СТР)<sub>2</sub> по сравнению с нативным rFVII.

[0466] **Блоты гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН.**

[0467] Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли путем загрузки 50 нг либо собранного, либо очищенного, либо активированного белка rFVII. Образцы загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ геля после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли путем иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга), применяя моноклональное антитело к FVII человека (АТ) (R&D Systems) или поликлональное антитело к СТР, полученное в кролике.

[0468] Уровень антигена rFVII коррелировал с обнаруженным уровнем белка на гелях после ЭФ в ПААГ/ДСН, подвергнутых иммуноблоттингу с АТ к FVII. rFVII-СТР мигрировал в виде одной полосы, тогда как соответствующая молекулярная масса контроля FVII составляла приблизительно 52 кДа (результаты не представлены). Оба белка реагировали с антителами, специфичными к FVII, на иммуноблотах. RFVII-СТР также реагировал с антителами, специфичными к СТР. rFVII секретировался в виде зимогена, при этом не было и следа активированного белка.

[0469] **Хромогенная активность FVII.**

[0470] Активности собранных rFVII, rFVII-СТР и rFVII-(СТР)<sub>2</sub> определяли, применяя доступный для приобретения набор для хромогенного анализа (набор AssaySense для анализа хромогенной активности FVII человека (AssayPro)). Для функциональной характеристики rFVII-СТР и его способности в дальнейшем активироваться (FVIIa), концентрированный собранный rFVII-СТР помещали в доступный для приобретения набор для хромогенного анализа, который позволяет измерить способность TF/FVIIa активировать фактор X в фактор Xa, в результате чего в присутствии специфичного субстрата FXa высвобождает сигнал, количество которого определяют (AssayPro). Добавление пептида СТР к С-концу белка rFVII не нарушало активность FVII как сериновой протеазы (фигура 20B, 20C).

[0471] **Свертывающая активность FVII.**

[0472] Протромбиновое время (ПВ) является мерой внешнего пути свертывания крови. ПВ представляет собой время (измеренное в секундах), которое требуется плазме для свертывания после добавления активатора внешнего пути, фосфолипида и кальция. Его используют для определения склонности крови к сворачиванию, в частности, для измерения дозировки варфарина, повреждения печени и статуса по витамину К. Эталонный диапазон для протромбинового времени обычно составляет приблизительно 12–15 секунд. В частности, в данном анализе осуществляли количественное определение способности собранных FVII-СТР и FVII-(СТР)<sub>2</sub> восстанавливать свертывающую активность плазмы человека, обедненной FVII, путем добавления rhFVII. 300 мкл плазмы человека, обедненной FVII, смешивали с 100 мкл собранных FVII, FVII-СТР и FVII-(СТР)<sub>2</sub> при определенных концентрациях, или объединенной нормальной плазмы человека, и дополнительно разбавляли. После инкубации в течение 60 секунд при 37°C, в смесь добавляли тканевый фактор (TF), CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды. Определяли время свертывания крови в секундах. Эффективность оценивали путем сравнения кривой дозовой зависимости собранных FVII-СТР и FVII-(СТР)<sub>2</sub> с эталонным препаратом, состоящим из rhFVII или объединенной плазмы человека. За одну единицу активного FVII

принимали такое количество FVII, активность которого была равна активности одного мл нормальной плазмы человека. ПВ свертывающей активности rFVII и rFVII-СТР измеряли на коагулометре (Instrumentation Laboratory).

[0473] Ранее показали, что добавление пептида СТР к С-концу белка rFVII не нарушало его активность как сериновой протеазы и приводило к стимуляции и активации нативного фактора X и фактора IX в плазме человека. После добавления дополнительных СТР на С-конце, наблюдалось трехкратное снижение активности сериновой протеазы (результаты не представлены).

[0474] **Фармакокинетическое исследование.**

[0475] Собранные rFVII, rFVII-СТР и rFVII-(СТР)<sub>2</sub> вводили внутривенно крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество) в дозе по 100 мкг/кг массы тела. Для всех экспериментов *in vivo*, количество соответствующего белка определяли с помощью набора для ELISA FVII. Для каждого исследуемого вещества FVII, инъецируемое количество рассчитывали, принимая во внимание различия в молекулярной массе между rFVII и rFVII-СТР, которые приводят к различным молярным концентрациям.

[0476] Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса, применяя измененную схему взятия образцов, чтобы минимизировать влияние процедуры взятия образцов на измеряемые уровни: поочередно из 3 крыс через 30 и 90 мин. и через 2, 6 и 48 ч., и из трех оставшихся крыс через 15 и 60 мин. и через 1,5, 4 и 24 ч. Плазму получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Осуществляли количественный анализ концентрации FVII с помощью анализа ELISA, специфичного для FVII. Период полужизни и площадь под фармакокинетической кривой (AUC) рассчитывали, применяя линейное правило трапеций. Сравнение данных параметров клиренса показало, что период полужизни *in vivo* и AUC для rFVII-(СТР)<sub>2</sub> были значительно выше, чем таковые для rFVII (таблица 30).

**Таблица 30.** Параметры ФК исследования

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

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

[0477] **Определение характеристик рекомбинантного FVIIa-СТР**

[0478] В процессе активации, FVII расщепляется в положении R152, что приводит к получению доменов тяжелой и легкой цепи, которые связаны одной дисульфидной связью. rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> очищали и активировали с помощью процесса очистки на ионообменной колонке. Для того, чтобы полностью оценить rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>, данный белок загружали на гель для ЭФ в ПААГ/ДСН при восстановительных условиях, на который также загружали доступный для приобретения FVIIa (NovoSeven®). Домены тяжелой и легкой цепи разделялись и мигрировали в виде двух отдельных полос с молекулярными массами 55 и 25 кДа. Оба белка реагировали с антителами, специфичными к FVII, но тяжелая цепь rFVIIa-CTP специфично реагировала с антителами, специфичными к CTP, свидетельствуя о том, что данная полоса представляет собой тяжелую цепь FVII, слитую с CTP. Легкая цепь специфично реагировала с АТ к гамма-карбоксилазе. Концентрацию белка FVIIa определяли с помощью набора для ELISA, специфичного к FVIIa.

#### [0479] **N-концевое секвенирование FVIIa**

[0480] Очищенные белки rFVII-CTP-CTP в активированной или зимогенной форме разделяли с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (на 12% трис-глициновом геле), а затем осуществляли электроблоттинг на мембрану PVDF. Интересующие полосы вырезали и помещали на очищенный обработанный биобреном (Biobrene) стекловолоконный фильтр. Анализ аминоконцевой последовательности осуществляли путем расщепления по Эдману, применяя импульсный жидкофазный белковый секвенатор, оборудованный микроградиентной системой ВЭЖХ 140 С. Идентичность рекомбинантного белка и правильное отщепление пропептида дополнительно проверяли с помощью аминоконцевого секвенирования.

#### [0481] **Свертывающая активность FVIIa**

[0482] Чтобы оценить коагулирующую активность FVII-(CTP)<sub>2</sub>, осуществляли анализ активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). В образец плазмы, обедненной FVII, добавляли rFVIIa (NovoSeven®) или rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>. 300 мкл плазмы человека, обедненной FVII, смешивали со 100 мкл FVIIa или rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> при определенных концентрациях, или с нормальной объединенной плазмой человека, и дополнительно разбавляли. После инкубации в течение 60 секунд при 37°C, в смесь добавляли тканевый фактор (TF), CaCl<sub>2</sub> и фосфолипиды. Определяли время свертывания крови в секундах. Эффективность оценивали путем сравнения кривой дозовой зависимости для rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> с таковой для эталонного препарата, состоящего из rhFVIIa или объединенной нормальной плазмы человека. За одну единицу FVIIa принимали такое количество FVIIa, активность которого была равна активности 1 мл нормальной плазмы человека. Свертывающую активность АЧТВ rFVII и rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> измеряли на

коагулометре (Instrumentation Laboratory). Свертывающая активность АЧТВ rFVIIa и rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> была сходной.

[0483] **Фармакокинетические исследования у крыс.**

[0484] Для того, чтобы охарактеризовать влияние добавления СТР к rFVIIa на увеличение его периода полужизни, проводили сравнительное фармакокинетическое исследование у крыс. NovoSeven® (rFVIIa) и rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> в TBS вводили путем в/в инъекции 6 крысам SD. Уровни FVIIa в динамике детектировали с помощью набора для ELISA FVIIa. Период полужизни и AUC рассчитывали для каждого белка. Сравнение полученных параметров клиренса показало, что величины *in vivo* периода полужизни, выхода и AUC для rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> превосходили таковые для NovoSeven®.

[0485] **Модель эффективности FVIIa-СТР *in vivo* (модель гемофилии у мышей, лишенных FVIII).**

[0486] Для того, чтобы оценить модель активности *in vivo*, получали мышей с нокаутированным геном FVIII, и создавали размножающуюся линию. 10 мкг либо доступного для приобретения рекомбинантного hFVIIa (NovoSeven®), либо rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> вводили путем инъекции в хвостовую вену анестезированной мыши (массой 22-28 г.) с нокаутированным геном FVIII. Количество инъекцированного белка было равно необходимой концентрации FVIII в нормальной плазме (5 мкг/мл). Образцы крови отбирали из рассеченного хвоста в гепаринизированные капиллярные трубки в определенные моменты времени. Оценивали уровни FVIIa в образцах плазмы с помощью ELISA и измеряли эффективность с помощью анализа свертывания крови ЧТВ.

[0487] В данном исследовании, получали слитую конструкцию FVII с СТР. Данный рекомбинантный белок представлял собой базовый компонент лечения, который обеспечивал увеличенный период полужизни и сохранение терапевтической эффективности.

[0488] Полученные результаты позволяют предположить, что rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> обладает терапевтической эффективностью, близкой к таковой для rFVIIa, у пациентов с гемофилией. Более того, данная технология требует менее частого введения. По-видимому, однократной инъекции rFVIIa-(СТР)<sub>2</sub> достаточно, чтобы контролировать эпизоды кровотечения и уменьшить количество инъекций, которые необходимы во время хирургического вмешательства. Данный рекомбинантный белок можно применять для длительного профилактического лечения.

#### **ПРИМЕР 5**

##### **Сравнительная оценка очищенных FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>**

[0489] **5.1 Цель исследования.**

[0490] Сравнительная оценка фармакокинетических параметров и свертывающей активности FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub>.

[0491] **5.2 Получение собранных FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>.**

[0492] КДНК FVII, слитого на С-конце с четырьмя или пятью последовательно присоединенными последовательностями СТР, экспрессировали в клетках Dg44, применяя систему экспрессии Excellgene, в присутствии 20 мкг/л витамина К3 (Sigma, Mennadion). Кондиционированные среды собирали (300 мл), фильтровали и замораживали.

[0493] **5.3 Получение собранного FVII-СТР<sub>3</sub>.**

[0494] FVII-СТР<sub>3</sub> экспрессировали внутри хозяина в системе экспрессии млекопитающего, в клетках CHO, применяя вектор pCI-DHFR. Стабильно трансфицированный пул №71 растили во встряхиваемых колбах в присутствии 25 нг/л витамина К3 (Sigma). Полученные суспензии клеток собирали и фильтровали.

[0495] Все собранные FVII-СТР (3, 4 и 5 СТР) концентрировали и диализовали против TBS (50 мМ трис, 150 мМ NaCl, pH 7,4), применяя кассету Pellicon XL с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа.

[0496] **5.4 Определение уровня антигена FVII.**

[0497] Уровень антигена FVII определяли с применением набора для ELISA FVII человека (Zymotest HyPhen) (таблица 31). Рассчитанная концентрация белка представляла собой среднее значение по двум независимым экспериментам.

**Таблица 31.** Уровень антигена FVII

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

[0498] **5.5 Иммуноблоттинг FVII-СТР.**

[0499] Собранные FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> загружали на 12% триглицидный гель (*expedion*), на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли с помощью вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга), применяя поликлональные АТ к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica).

[0500] FVII, слитый с тремя, четырьмя и пятью СТР, мигрировал на уровне 80, 90 и 100 кДа, соответственно. Как и ожидалось, собранные FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>, полученные от

Excellgene, обладали низким гамма-карбоксилированием по сравнению с собранным FVII-СТР<sub>3</sub>, который был получен от Prolor, поскольку процесс получения не был оптимизирован (фигура 21).

[0501] **5.6 Сравнительная оценка активности FVII *in vitro*.**

[0502] Сравнительную оценку активности *in vitro* очищенных на ГА-колонке (сильно гамма-карбоксилированная фракция) FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Готовили серийные разведения всех образцов и оценивали активность путем сравнения кривой дозовой зависимости образцов с таковой для эталонного лекарственного средства, состоящего из нормальной плазмы человека. Для FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> продемонстрировали более низкую хромогенную активность, чем для объединенной нормальной плазмы (фигура 22). Для FVII-СТР<sub>4</sub> продемонстрировали более высокую активность, как видно из отношений EC<sub>50</sub>, по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (таблица 32).

**Таблица 32.** Свертывающая активность FVII *in vitro*

Образец	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	Отношение EC <sub>50</sub> образец /плазма
Плазма	0,05	
FVII 3СТР	0,12	2,72
FVII 4СТР	0,03	0,71
FVII 5СТР	0,06	1,35

[0503] **5.7 Свертывающая активность FVII *in vitro*.**

[0504] Анализ активности фактора VII (FVII), который проводили в Медицинском центре им. Шибы, в Национальном центре свертывания крови Израиля, представлял собой анализ на основе протромбина (ПВ) с применением иммуносорбированной плазмы, обедненной фактором VII (Siemens). Реагент ПВ представлял собой инновин (innovin), и анализ осуществляли с помощью устройства CA 1500 Sysmex®. Нормальный диапазон FVII составлял 55 - 145%.

**Таблица 33.** Хромогенная активность FVII *in vitro*

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

[0505] Поскольку нормальный уровень циркулирующего в организме FVII составляет приблизительно 0,5 мкг/мл, выявили 3-кратное снижение коагулирующей активности собранных FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека; данный результат коррелирует с полученной хромогенной активностью (таблица 33).

[0506] Собранный FVII-СТР<sub>4</sub> проявил 3-кратное повышение потенциальной коагулирующей активности по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека, что наблюдали в анализе хромогенной активности (таблица 33). Процент активности FVII-СТР<sub>4</sub> был гораздо выше, чем процент активности FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>. Методологические ограничения метода ELISA могут ограничить точность расчетов уровня АГ FVII-СТР<sub>4</sub>.

#### [0507] 5.8 Фармакокинетическое исследование.

[0508] Проводили два фармакокинетических исследования, чтобы определить фармакокинетические (ФК) параметры FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>. В процессе первого исследования, FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (группы А, В и С, соответственно) вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на группу лечения) в дозе 250 мкг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 и 96 часов после введения (таблица 34). Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

**Таблица 34.** Дизайн фармакокинетического исследования – концентрированный собранный продукт

Группа лечения	Исследуемый препарат	Количество животных/группу/	Путь введения	Уровень дозы (мкг на	Инъекционный объем	Конц. (мкг/мл)	Моменты времени (часы после введения)
----------------	----------------------	-----------------------------	---------------	----------------------	--------------------	----------------	---------------------------------------

		момент времени		животно е)	(мкл)		
A	FVII- СТР*3	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
B	FVII- СТР*4	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FVII- СТР*5	6	в/в	50	200	250	0 (до введения) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

[0509] Осуществляли количественный анализ концентрации FVII в образцах плазмы, применяя наборы для ELISA FVII человека (Zymutest FVII-Biophen). Рассчитывали фармакокинетический профиль, и он представлял собой средние значения по 3 животным в каждый момент времени. Значения конечного периода полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. Ниже в таблице 35 кратко описаны рассчитанные концентрации FVII в различные моменты времени взятия образцов. ФК профиль (фигуры 23 - 24) и краткое описание ФК параметров (таблица 36) также представлены ниже. Для FVII-СТР<sub>5</sub> продемонстрировали лучший профиль по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>4</sub> (таблица 36).

**Таблица 35.** Первое фармакокинетическое исследование - концентрации FVII

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

**Таблица 36.** Фармакокинетический анализ

FVII 3-СТР	FVII-4-СТР	FVII-5СТР
------------	------------	-----------

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

[0510] Добавление четырех или пяти СТР значительно продлевало период полужизни FVII по сравнению с добавлением 3 СТР в 2 и 3 раза, соответственно (таблица 36). Такое превосходство было наиболее важным в начальной части исследования (0,083 - 8 ч.), позволяя предложить потенциально улучшенный выход белка и пониженный внесосудистый клиренс. AUC после введения FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> увеличилась в 3 и 4 раза, соответственно, по сравнению с FVII-СТР<sub>3</sub>. Клиренс также уменьшился при добавлении 4 и 5 СТР к FVII (таблица 36).

[0511] В данном исследовании наблюдали, что добавление четырех и пяти СТР значительно продлевало период полужизни FVII по сравнению с добавлением 3 СТР, причем как начальный, так и конечный период полужизни. Значения периода полужизни в первом и втором исследовании были различными вследствие различных аналитических подходов, и на них влияла доза и продолжительность исследования, тем не менее, общая тенденция сохранялась. AUC после введения FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> увеличилась в 2,5 и 7 раз, соответственно, по сравнению с таковой для FVII-СТР<sub>3</sub>.

#### [0512] 5.9 Выводы.

[0513] В данном исследовании оценивали ФК параметры и потенциальную свертывающую активность FVII-СТР<sub>3</sub>, FVII-СТР<sub>4</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>. Присоединение 4 и 5 СТР к FVII обеспечивало наибольший и улучшенный период полужизни, улучшенное воздействие и пониженный клиренс по сравнению с присоединением FVII-СТР<sub>3</sub>, при этом сохранялась сходная хромогенная активность и свертывающая активность *in vitro*. Данные результаты наблюдали при различных концентрациях белка, и они были сходными у собранного и очищенного белка. При оценке влияния присоединения СТР к С-концу FVII в целом, присоединение 1-5 СТР значительно увеличивало период полужизни и AUC FVII пропорционально присоединенным СТР, позволяя предложить, что по мере увеличения количества молекул СТР, период полужизни и стабильность FVII значительно улучшались, при этом сохранялась его исходная свертывающая активность *in vitro*, как показано ниже в настоящем тексте в таблице 37.

Таблица 37

Сравнительная оценка	Процент увеличения $T_{1/2}$	Процент увеличения AUC
FVII по сравнению с FVII-СТР <sub>2</sub>	268	200
FVII-СТР <sub>2</sub> по сравнению с FVII-СТР <sub>3</sub>	67	57,8
FVII-СТР <sub>3</sub> по сравнению с FVII-СТР <sub>4</sub>	24	178
FVII-СТР <sub>4</sub> по сравнению с FVII-СТР <sub>5</sub>	6	42

[0514] Ранее сообщали, что период полужизни FVII коррелировал с периодом полужизни активированной формы FVII (FVIIa) как у людей, так и у животных. Следовательно, ожидается, что будет достигнуто аналогичное улучшение периода полужизни для активированного варианта после присоединения СТР.

### ПРИМЕР 6

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

[0515] Проводили исследования, описанные выше в настоящем тексте, в которых тестировали ФК профиль и коагулирующую активность собранных FVII-СТР, FVII-СТР<sub>2</sub> и FVII-СТР<sub>3</sub> по сравнению с таковыми у доступного для приобретения FVII. Для FVII-СТР<sub>3</sub> выявили улучшенный ФК профиль, при сохранении его коагулирующей активности, по сравнению с таковым для собранных FVII-СТР и FVII-СТР<sub>2</sub> или rhFVII. Для того, чтобы дополнительно охарактеризовать свойства FVII-СТР<sub>3</sub> *in vitro* и *in vivo*, получили небольшой стабильный пул клеток, экспрессирующих и секретирующих указанный белок, и разработали процессы очистки и активации.

[0516] В настоящем исследовании исследовали фармакокинетические и фармакодинамические свойства FVIIa-СТР<sub>3</sub> у мышей, лишенных FVIII. Оценивали ФК профиль белка. Определяли ФК профиль на основании удельной активности FVIIa и сравнивали с таковым у доступного для приобретения продукта NovoSeven®. Кроме того, исследовали *in vivo* длительную гемостатическую способность FVIIa-СТР<sub>3</sub> (способность вызывать свертывание крови) у мышей, лишенных FVIII, после рассечения хвостовой вены (исследование выживаемости).

[0517] **Цели исследования.**

[0518] Оценить фармакокинетические и фармакодинамические параметры FVIIa-СТР<sub>3</sub> по сравнению с таковыми у доступного для приобретения rhFVIIa (NovoSeven®) у мышей, лишенных FVIII, после однократного в/в введения сходной дозы активности.

[0519] Определить способность *in vivo* FVIIa-СТР<sub>3</sub> поддержания гомеостаза у мышей, лишенных FVIII, после однократного в/в введения FVIIa-СТР<sub>3</sub> и NovoSeven® в сходной дозе активности, после чего проводили испытание рассечением хвостовой вены (исследование выживаемости).

[0520] **Получение собранного FVII-СТР<sub>3</sub>.**

[0521] FVII-СТР<sub>3</sub> экспрессировали внутри хозяина в клетках Dg44, применяя вектор pCI-DHFR. Стабильный трансфицированный пул №71 растили во встряхиваемых колбах, в присутствии 25 нг/л витамина К3 (Sigma). Суспензию клеток культивировали и собирали после снижения жизнеспособности до 60-80%. Собранные суспензии фильтровали и замораживали при -70°C.

[0522] **Определение уровня антигена собранного FVII.**

[0523] Уровень антигена FVII определяли с применением набора для ELISA FVII человека (Zymotest HyPhen) (таблица 38). Уровень антигена рассчитывали для каждой объединенной собранной партии.

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

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

[0524] **Процесс очистки FVII-СТР<sub>3</sub> (фигура 25).**

[0525] **План процесса.**

[0526] После короткого исследования очистки, осуществляли следующий процесс очистки, применяя 2 колонки. С помощью аффинной колонки VII-Select (GE) и колонки с керамическим гидроксипатитом типа 1 (ГА), 40 мкм (Bio Rad), очищали обогащенный гамма-карбоксилированный белок FVII-СТР<sub>3</sub>. Самоактивацию вызывали путем инкубации очищенного FVII-СТР<sub>3</sub> в присутствии CaCl<sub>2</sub> в течение ночи при 2 - 8°C. Процесс очистки находился на конечной стадии разработки и его оптимизировали, поэтому часть этапов очистки не была идентичной для двух партий.

[0527] **Ультрафильтрация/диафильтрация (УФ-ДФ) с применением кассеты из полового волокна или кассеты Pellicon с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа.**

[0528] Осветленную собранную суспензию клеток размораживали при 4°C в течение выходных (2-3 дней).

[0529] Для партии 31, осветленную собранную суспензию клеток (12 литров) концентрировали в 4 раза (двумя последовательными циклами), применяя картридж из полого волокна (GE Healthcare, номер в каталоге UFP-10-C-4X2MA) с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа. Концентрированную суспензию клеток подвергали диафильтрации против 1 - 2 объемов TBS (50 mM трис, 150 mM NaCl, pH 7,4).

[0530] Для партии 38, осветленную собранную суспензию клеток (8,5 литров) концентрировали в 4 раза, применяя кассету Pellicon 2 (Millipore) с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа. Концентрированную суспензию клеток непосредственно загружали на колонку VII-Select.

[0531] Обе ультрафильтрации осуществляли на льду с ледяными буферами. Образцы УФ-ДФ фильтровали перед загрузкой через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

#### [0532] **Захват на колонке FVII-Select**

[0533] УФ-ДФ или концентрированную собранную суспензию клеток загружали на колонку VII-Select (XK16/20, объем колонки 18 мл), заранее уравновешенную TBS, pH 7,4. Колонку промывали 50 mM трис-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5, и элюировали FVII-СТР<sub>3</sub> 50 mM трис-HCl, 1 M NaCl, 50% (в объемном отношении) пропиленгликоль, pH 7,5. Процесс осуществляли двумя последовательными циклами с применением одной и той же колонки.

#### [0534] **Разделение на колонке с керамическим гидроксипатитом на основе гамма-карбоксилирования**

[0535] Элюированный продукт разбавляли 1:10 10 mM фосфатом натрия, pH 6,8, и загружали на колонки с керамическим гидроксипатитом (XK16/20, объем колонки 24 мл). Колонку промывали 59 mM фосфата натрия, pH 6,8, и сильно гамма-карбоксилированную фракцию фактора VII элюировали 500 mM фосфатом натрия, pH 6,8. Данный процесс осуществляли двумя последовательными циклами на одной и той же колонке. Для каждой партии, элюаты после двух циклов объединяли и концентрировали до 1,7 - 2 мг/мл и подвергали диафильтрации с 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,2, чтобы уменьшить объем и подготовить материал к этапу активации.

#### [0536] **Активация FVII.**

[0537] Очищенный FVII-СТР<sub>3</sub> разбавляли до 1 мг/мл и инкубировали с 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl и 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,2, при 2 - 8°C в течение 24 часов. Активацию завершали заменой буфера (УФ-ДФ) на предварительный рецептурный буфер (20 mM цитрат, 240 mM NaCl, 13,3 mM глицин, pH 6,9).

[0538] **Аналитические свойства FVII-СТР<sub>3</sub> и FVIIa-СТР<sub>3</sub>.**

[0539] **ЭФ в ПААГ/ДСН и вестерн-блоттинг.**

[0540] Очищенные FVII-СТР<sub>3</sub> и FVIIa-СТР<sub>3</sub> загружали на 12% трис-глициновый гель, на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ ЭФ в ПААГ/ДСН с помощью окрашивания кумасси осуществляли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым голубым (5 или 10 мкг белка/дорожку). Осуществляли анализ методом вестерн-блот (1 мкг белка/дорожку), применяя поликлональные АТ к FVII человека (R&D Systems; AF2338), моноклональное антитело, узнающее гамма-карбоксилирование белка человека (American Diagnostics, номер в каталоге 499, 3570), и поликлональные АТ к СТР. При восстановительных условиях, FVII-СТР<sub>3</sub> мигрировал на уровне 75 кДа, а FVIIa-СТР<sub>3</sub> мигрировал в виде двух основных полос: тяжелой цепи на уровне 50 кДа и легкой цепи на уровне 25 кДа, представленных на фигуре 26 как полосы 2 и 3, соответственно.

[0541] Процедура очистки позволила значительно повысить содержание FVII-СТР<sub>3</sub> и уменьшить количество примесей. Выход процесса очистки составлял 25-30% FVII (согласно ELISA). Большая часть белка, потерянного в процессе очистки, обладала низкой хромогенной активностью FVII или не обладала активностью. На основании окрашивания кумасси геля после ЭФ в ПААГ/ДСН выявили, что восстановленный FVIIa-СТР<sub>3</sub> мигрировал большим количеством полос, чем предсказывали. Полоса, которая мигрировала на уровне приблизительно ~75 кДа представляла собой неактивированный FVII (фигура 26, полоса 1). Данная полоса состояла из двух полос с незначительными различиями в молекулярной массе, что может отражать различную степень гамма-карбоксилирования. Также наблюдали дополнительные полосы с молекулярной массой ниже 20 кДа. Ранее было описано, что они представляют собой продукты деградации тяжелой цепи.

[0542] **Хромогенная активность FVII-СТР<sub>3</sub>.**

[0543] Сравнительная оценка активности *in vitro* собранного FVII-СТР<sub>3</sub>, фракций в процессе очистки и очищенного FVII-СТР<sub>3</sub> по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека осуществляли, применяя доступный для приобретения набор для анализа хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Готовили серийные разведения собранного FVII-СТР<sub>3</sub> и очищенного белка и оценивали эффективность путем сравнения кривой дозовой зависимости с таковой для эталонного препарата нормальной плазмы человека. После очистки FVII-СТР<sub>3</sub>, хромогенная активность значительно улучшалась, и неактивные фракции преимущественно отделяли на ГА-колонке (фигура 27). Наблюдали сильную корреляцию между хромогенной активностью FVII и

обнаружением FVII моноклональными антителами к Gla на вестерн-блоте. По значению EC50 видно, что хромогенная активность FVII в собранном материале была нарушена как в карбоксилированной, так и в некарбоксилированной фракции FVII. После очистки и обогащения гамма-карбоксилированной фракцией FVII-CTP<sub>3</sub>, активность улучшалась, демонстрируя существенный вклад гамма-карбоксилирования в активность FVII (фигура 27). Данный параметр важен для адекватной активности FVII *in vivo* и будет дополнительно проработан в программе разработки клонов.

[0544] **Определение количества белка на длине волны A280.**

[0545] Теоретический коэффициент поглощения FVIIa-CTP<sub>3</sub> и NovoSeven® рассчитывали, применяя алгоритм ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Расчет был основан на последовательности аминокислот. Рассчитанные коэффициенты поглощения для FVII-CTP<sub>3</sub> и NovoSeven® составляли 1,186 и 1,406, соответственно. Данные значения представляют собой поглощение 1 г/л при 280 нм.

[0546] Различие в коэффициенте поглощения между двумя белками возникло исключительно благодаря увеличению молекулярной массы FVIIa-CTP<sub>3</sub> по сравнению с NovoSeven®, поскольку в CTP отсутствуют ароматические и остатки цистеина, следовательно, он не вносит вклад в поглощение.

[0547] Определение количества белка на A280 использовали для конечного FVII и для очищенных образцов в процессе очистки, начиная с элюирования с колонки VII-Select.

[0548] **Определение уровня антигена FVIIa.**

[0549] Уровень антигена FVIIa определяли с применением набора для ELISA FVIIa человека (IMUBIND, American Diagnostica). Уровень антигена рассчитывали для каждой партии. Тем не менее, данный способ не был полезен для определения дозы для инъекции, поскольку он не отражал количество активного продукта.

[0550] **Анализ свертывания крови FVIIa- Staclot® VIIa-rTF.**

[0551] FVIIa получали путем расщепления внутри цепи одноцепочечного FVII. Нативный тканевый фактор (TF) представляет собой кофактор FVIIa. При связывании с TF, FVII опосредует активацию фактора X в Xa, при этом сам превращается в FVIIa. Растворимый тканевый фактор представляет собой внеклеточную часть нативного тканевого фактора. Он больше не может активировать FVII путем самоактивации, но FVIIa, связанный с тканевым фактором, может активировать FX в FXa.

[0552] Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF), применяемый в данном анализе, специфичен к FVIIa, что используют для создания анализа свертывания крови FVIIa. RsTF в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов приводит к свертыванию плазмы без активации FVII в FVIIa.

[0553] Наблюдаемое время свертывания крови в данной системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в исследуемом образце, и не зависит от присутствия FVII в образце.

[0554] Анализ проводили в Omri Laboratories (Нес-Циона, Израиль). Активность FVIIa оценивали как у NovoSeven® после восстановления влагосодержания, так и у FVIIa-СТP<sub>3</sub> перед каждым исследованием. Активность NovoSeven® не коррелировала с предполагаемой активностью, указанной на флаконе, но такое несоответствие могло возникнуть вследствие различных подходов к оценке активности. В таблице 39 кратко описана свертывающая активность FVIIa на объем без учета концентрации белка.

**Таблица 39.** Свертывающая активность FVIIa в продуктах партий

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

[0555] **Удельная активность FVIIa-СТP<sub>3</sub>.**

[0556] Удельную активность (УА) FVIIa (которую рассчитывали как активность/мл, деленную на концентрацию белка) рассчитывали на основании A280 и представили в таблице 40. При сравнении удельных активностей двух указанных молекул, которые отличаются по молекулярной массе, нужно внести корректировку для того, чтобы нормировать активность (т.е. вследствие различия в молекулярной массе, количество активных сайтов в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раз больше, чем в 1 мг FVIIa-СТP<sub>3</sub>). Расчет переводного коэффициента представлен в следующем уравнении:

Нормированная\_УА = (УА(FVIIa-СТP<sub>3</sub>)/мол. массу(FVII-СТP<sub>3</sub>)) x мол. массу нативного FVII = (УА(FVIIa-СТP<sub>3</sub>)/53419,5 Да) x 45079,1 Да = (УА(FVIIa-СТP<sub>3</sub>) x 1,185

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

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

[0557] **Исследование ФК-ФД FVIIa-СТP<sub>3</sub>.**

[0558] **План исследования.**

[0559] FVIIa-CTP<sub>3</sub> и rhFVIIa (NovoSeven®, NS) вводили однократной внутривенной инъекцией мышам C57B, лишенным FVIII, в дозе  $6,4 \cdot 10^6$  ед./кг массы тела (160000 ед./животное). Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 4 мышей поочередно через 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 и 72 часа после введения (таблица 41). Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa и проводили тщательный ФК анализ. Исследование осуществляли в Omgi Laboratories (Нес-Циона, Израиль).

**Таблица 41.** Схема исследования

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество животных/ группу/ момент времени	Путь введения	Количество единиц/ животное	Инъецированный объем (мкл)	Моменты времени (часы после введения)
А	rhFVIIa	4	в/в	$1,6 \cdot 10^5$	200	0 (до введения) 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
В	FVIIa-CTP <sub>3</sub>	4	в/в	$1,6 \cdot 10^5$	200	0 (до введения) 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

[0560] **ФК профиль FVIIa-CTP<sub>3</sub> у мышей, лишенных FVIII**

[0561] Осуществляли количественный анализ активности FVIIa в образцах крови, применяя набор StacLOT® VIIa-rTF (Stago, Парсиппани, Нью-Джерси). Для каждого белка рассчитывали фармакокинетический профиль и он представлял собой среднее значение по 4 животным в каждый момент времени. На фигуре 28 представлен ФК профиль FVIIa в процессе эксперимента. Выход FVIIa представлен в таблице 42. Краткое описание ФК параметров представлено в таблице 43.

[0562] В таблице 41 кратко описаны значения свертывающей активности после введения либо NovoSeven®, либо FVIIa-CTP<sub>3</sub>. FVIIa-CTP<sub>3</sub> и NovoSeven® достигали максимальной активности через полчаса после введения. Наивысшее значение активности

NovoSeven® достигло лишь 43% максимального значения активности FVIIa-СТP<sub>3</sub>. Свертывающая активность FVIIa-СТP<sub>3</sub> сохранялась в течение более продолжительного периода времени, демонстрируя продленную активность. Свертывающая активность у мышей, которых лечили NovoSeven®, не детектировалась в моменты времени после 12 часов, тогда как у мышей, которых лечили FVII-СТP<sub>3</sub>, измеримая активность продолжала сохраняться в течение 48 часов после введения (таблица 41 и фигура 28).

[0563] Добавление трех последовательно присоединенных копий СТР к FVIIa повышало выход на 100% (таблица 42), что измеряли по наибольшей активности после введения и сравнивали с предполагаемой активностью на основании анализа *in vitro*, и увеличивало период полужизни и среднее время удерживания (MRT) в 5 раз. Время воздействия (AUC) повышалось в 3 раза (таблица 43).

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

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

**Таблица 42.** Выход FVIIa-СТP<sub>3</sub>

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество единиц/животное	Фактическая и вводимая доза (ед./мл)	*Предполагаемая Смах (ед./мл крови)	Смах (ед./мл)	% выхода
А	rFVIIa	$1,60 \cdot 10^5$	$1,20 \cdot 10^6$	$1,40 \cdot 10^5$	$4,25 \cdot 10^4$	<b>30</b>
В	FVIIa-СТP <sub>3</sub>	$1,60 \cdot 10^5$	$1,29 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^5$	$9,74 \cdot 10^4$	<b>64,6</b>

\*Предполагаемая Смах представляет собой вводимую дозу, деленную на объем крови

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

ФК параметры	NovoSeven®	FVIIa-СТP <sub>3</sub>
Период полужизни- $\alpha$ (0,5 - 12 ч.)	<b>0,94</b>	1,57

Период полужизни- $\beta$ (12 - 48 ч.)	НД	<b>4,62</b>
AUC (мЕд. *ч/мл)	$5,80 \cdot 10^7$	$1,80 \cdot 10^8$
Vd/кг (мл/кг)	1408	2375
CL/кг (мл/ч/кг)	1034	356
MRT (ч.)	1,3	6,7

**[0564] Анализ образования тромбина (TGA)**

[0565] Образование тромбина является основной частью каскада свертывания крови, и по существу оценка того, насколько хорошо конкретный индивид может образовывать тромбин, может коррелировать с риском кровотечения или тромбоза. Переменные, которые обычно измеряют при анализе образования тромбина, включают: время задержки, время до пика образования тромбина, пик, эндогенный потенциал тромбина (ETP) (т.е., площадь под фармакокинетической кривой и хвостом), динамика тромбограммы ("TG"). После времени задержки, наблюдался выброс тромбина. Тем не менее, свертывание крови происходит по окончании времени задержки, когда более чем 95% всего тромбина еще не образовалось. Анализ образования тромбина проводили в Omri Laboratories, применяя реагенты Thrombinoscope, дополненные гемофильной плазмой человека. TGA отражает способность свертывания плазмы мышей, вызванную инъекцией NovoSeven® и FVIIa-CTP<sub>3</sub>. На фигуре 29 представлены значения параметров TGA для плазмы мышей после введения FVIIa-CTP<sub>3</sub> или NovoSeven®. После введения FVIIa-CTP<sub>3</sub>, все три параметра (скорость образования тромбина, максимальное количество образованного тромбина и KIIa) демонстрируют преимущество лечения FVII-CTP<sub>3</sub> над лечением NovoSeven®. Это дополнительно подкрепляет наличие преимущества потенциального пролонгированного действия FVII-CTP<sub>3</sub> над NovoSeven®.

**[0566] Исследование лечения FVIIa-CTP<sub>3</sub> после рассечения хвостовой вены (PXB)**

**[0567] План исследования**

[0568] Результаты, полученные при исследовании ФК/ФД FVIIa-CTP<sub>3</sub>, дали представление о функциональных свойствах FVIIa-CTP<sub>3</sub> и продемонстрировали, что FVIIa-CTP<sub>3</sub> обладает фармакокинетическим преимуществом над NovoSeven®. Тем не менее, способность белка вызывать свертывание крови *in vivo* после травматического случая еще не была продемонстрирована. Чтобы оценить способность FVIIa-CTP<sub>3</sub> останавливать кровотечение, использовали ту же модель мышей, лишенных FVIII, для теста с кровотечением.

[0569] Мышам, лишенным FVIII, вводили однократную внутривенную инъекцию FVIIa-CTP<sub>3</sub> или NovoSeven®. Мышам вводили дозу лекарственного средства в количествах, которые обеспечивали эквивалентную FVIIa активность ( $1,6 \cdot 10^5$  единиц, 200 мкл),

рассчитанную в соответствии с эффективностью каждого лекарственного средства, оцененной в анализе свертывающей активности FVIIa (таблица 44). Вводимые дозы составляли 9 мг/кг NovoSeven® и 40 мг/кг FVIIa-CTP<sub>3</sub> вследствие пониженной активности FVIIa-CTP<sub>3</sub>. Контрольной группе вводили путем инъекции 200 мкл среды.

[0570] Хвостовую вену рассекали на расстоянии 2,7 см от кончика хвоста через 15 мин (инъекция 1), 24 часа (инъекция 2) или 48 часов (инъекция 3) после введения, и выживаемость мышей регистрировали в течение 24 часов.

**Таблица 44.** Оценка введенных путем инъекции образцов

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

[0571] Концентрацию белка определяли по A280.

[0572] **Результаты**

[0573] Результаты для контрольных групп, которым вводили среду путем трех инъекций (5 животных x 3 инъекции), кратко описали и представили на фигуре 30. Наблюдали выживаемость 30% через 24 часа после рассечения хвостовой вены.

[0574] У мышей, которых лечили NovoSeven® и FVIIa-CTP<sub>3</sub>, продемонстрировали адекватную гемостатическую активность после рассечения хвостовой вены, которое осуществляли через 15 мин после введения FVIIa. У животных, которых лечили FVIIa-CTP<sub>3</sub> и NovoSeven®, наблюдали коэффициент выживаемости 100% (фигура 30).

[0575] Пониженная скорость выведения FVIIa-CTP<sub>3</sub>, которую продемонстрировали в исследовании ФК/ФД, была наиболее явно видна, когда рассечение хвостовой вены осуществляли через 24 часа после введения. Наблюдалось уменьшение коэффициента выживаемости для NovoSeven®. Аналогично контрольной группе, 50% смертей наблюдалось в течение 10 часов. Тем временем, 90% мышей, которых лечили FVIIa-CTP<sub>3</sub>, выжило (фигура 30). Полученные результаты подчеркивают длительную эффективность лечения FVIIa-CTP<sub>3</sub>.

[0576] Через 48 часов после введения, продемонстрировали уменьшение коэффициента выживаемости в группах, которых лечили любым из FVIIa-СТР<sub>3</sub> и NovoSeven® (фигура 30С). Наблюдали небольшое улучшение у мышей, которых лечили FVIIa-СТР, но различие не достигло статистической значимости.

[0577] **Обсуждение**

[0578] Слияние СТР с рекомбинантными белками продлевает период полужизни белков из кровообращения, при этом сохраняется их сопоставимая активность. Хотя механизм, обуславливающий пониженный клиренс белка больше порогового размера 70 кДа, хорошо изучен по сравнению с почечным клиренсом, дополнительной защиты добиваются после присоединения СТР. Полагают, что присоединение СТР разворачивает белковый щит и защищает его от протеолитического расщепления, увеличивает его радиальную молекулярную массу благодаря сильно отрицательному заряду и уменьшает его аффинность к рецепторам клиренса печени.

[0579] Целью настоящего исследования было дать определенное представление о влиянии слияния СТР с FVII на период полужизни и клиренс белка, а также исследовать его удельную активность после данной модификации. Мышам, лишенным FVIII, вводили однократную в/в инъекцию FVIIa-СТР<sub>3</sub> или доступного для приобретения рекомбинантного FVIIa (NovoSeven®) в сходных дозах (в единицах), и осуществляли ФК анализ на основании активности. Для FVIIa-СТР<sub>3</sub> продемонстрировали большее время полужизни, как видно по 5- и 3,5-кратному увеличению периода полужизни и AUC, соответственно. Было показано, что удельная активность (ед./мг) FVIIa-СТР, рассчитанная по активности, определенной с помощью набора Staclot®, деленной на концентрацию белка, измеренную на A280, была в 4 - 5 раз ниже, чем удельная активность NovoSeven®.

[0580] Чтобы закрепить понимание того, как СТР влияет на кровоостанавливающее действие FVIIa *in vivo*, исследовали способность FVIIa-СТР<sub>3</sub> уменьшать кровотечение. В модели кровотечения с рассечением хвостовой вены, в модели мышей с гемофилией, введение rFVIIa могло улучшить коэффициент выживаемости подвергнутых рассечению животных и избежать у них смертельного кровотечения. В исследовании, описанном в настоящем тексте, животным вводили FVIIa-СТР<sub>3</sub> или NovoSeven®. Обе молекулы были способны поддерживать гомеостаз, если рассечение осуществляли через 0,25 часа после введения. Значительно дольше продолжительность активности продемонстрировали для группы лечения FVIIa-СТР<sub>3</sub>, когда рассечение хвоста осуществляли через 24 ч. после введения. Коэффициент выживаемости в группе лечения средой был выше, чем предполагаемый, и выше, чем полученный в предыдущих исследованиях (50% по сравнению с 20% в предыдущих исследованиях, результаты не представлены). Процент

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

[0581] В заключение, продемонстрировали, что FVIIa-СТР<sub>3</sub> обладает большей продолжительностью активности у мышей с гемофилией, которая приводит к большей продолжительности кровоостанавливающего действия по сравнению с NovoSeven®. Полученные результаты позволяют предположить, что слияние СТР с FVII представляет собой технологию, которая потенциально может значительно улучшить профилактическое лечение пациентов с гемофилией.

***ПРИМЕР 7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ ОЧИЩЕННОГО FVII-СТР<sub>3</sub> ПО СРАВНЕНИЮ С ТАКОВЫМ ДЛЯ FVII-СТР<sub>5</sub> ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОЙ В/В ИЛИ П/К ИНЪЕКЦИИ КРЫСАМ SD***

**Цель исследования**

[0582] Проводили два исследования.

[0583] Целью первого исследования было определить фармакокинетические параметры rFVII-СТР<sub>3</sub> по сравнению с rFVII-СТР<sub>5</sub> после очистки на колонке FVII-Select (FVII-S) и ГА-колонке у самцов крыс линии Sprague-Dawle, после однократного внутривенного введения 50 мкг/животное.

[0584] Во втором исследовании изучали фармакокинетические параметры rFVII-СТР<sub>3</sub>-ГА по сравнению с rFVII-СТР<sub>5</sub>-ГА у самцов крыс линии Sprague-Dawle после однократного внутривенного или подкожного введения 100 мкг/животное.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

**[0585] Определение уровня антигена FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub>**

[0586] Уровень антигена FVII определяли с применением набора для ELISA FVII человека (Zymotest HyPhen) (см. таблицу 45).

[0587] **Таблица 45.** Кратко описана рассчитанная концентрация белка, которая представляет собой среднее значение по трем независимым экспериментам.

	FVII 3 СТР		FVII 5 СТР	
	FVII-S 46 эл. конц. диал.	FVII-ГА 46 эл. конц. диал.	FVII-S эл. конц. диал.	FVII-ГА 5 100% В конц. диал.
Сред. (нг/мл)	$3,78 \cdot 10^6$	$1,59 \cdot 10^6$	$1,88 \cdot 10^6$	$7,92 \cdot 10^5$
СО	$1,30 \cdot 10^6$	$6,03 \cdot 10^5$	$7,15 \cdot 10^5$	$3,57 \cdot 10^5$
КВ (%)	$3,43 \cdot 10^1$	$3,80 \cdot 10^1$	$3,80 \cdot 10^1$	$4,51 \cdot 10^1$

### Анализ методом вестерн-блот исследованных образцов

[0588] Образцы FVII-СТР<sub>3,5</sub> загружали на 4 - 12% бис-трис гель (*NuPage, invitrogene*), на который также загружали маркер молекулярной массы белков Precision plus dual color (Bio-Rad). Анализ гелей после ЭФ в ПААГ/ДСН осуществляли с помощью вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга), применяя поликлональные АТ к FVII (R&D Systems), поликлональные АТ к СТР (Adar Biotech Production) или АТ к Gla (American Diagnostica). Вкратце, FVII, слитый с тремя и пятью СТР, мигрировал на уровне 80 и 100 кДа, соответственно (см. фигуру 31).

### Сравнительная оценка активности FVII *in vitro*

[0589] Анализ активности FVII, который проводили в Медицинском центре им. Шибы, в Национальном центре свертывания крови, представлял собой анализ на основе ПВ с применением иммуноадсорбированной плазмы, обедненной фактором VII (Siemens). Реагент ПВ представлял собой инновин (innovin), и анализ осуществляли с помощью устройства CA 1500 Sysmex. Нормальный диапазон FVII составлял 55 - 145%. Активности образцов кратко описаны в таблице 46.

**Таблица 46.** Активность образцов

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

		0,5	10	
--	--	-----	----	--

[0590] Нормальный уровень циркулирующего в организме FVII составляет приблизительно 0,5 мкг/мл. Оба FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> проявили приблизительно 5-кратное снижение коагулирующей активности по сравнению с объединенной нормальной плазмой человека.

#### **Фармакокинетическое исследование**

[0591] Проводили два фармакокинетических исследования, чтобы определить фармакокинетический (ФК) профиль и параметры FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> (после очистки на колонке FVII-Select и колонке FVII-ГА). В первом исследовании, FVII-СТР<sub>3</sub> и FVII-СТР<sub>5</sub> после очистки на колонке FVII-Select/ГА вводили однократной внутривенной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество) в дозе 50 мкг/крысу.

[0592] Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения. Цитратную плазму (0,38%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа.

[0593] Во втором исследовании изучали только образцы после ГА-колонки. Данные образцы вводили однократной внутривенной или подкожной инъекцией крысам линии Sprague-Dawle (по шесть крыс на вещество), применяя дозу 100 мкг/крысу. Образцы крови собирали в те же моменты времени и при тех же условиях, что и в первом исследовании, описанном выше.

[0594] **Таблица 47.** Дизайн первого исследования (FVII-Select по сравнению с FVII-ГА).

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

[0595] **Таблица 48.** Дизайн второго исследования (внутривенное введение по сравнению с подкожным)

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

[0596] Основные различия между данными двумя исследованиями представляли дозировки и путь введения. В первом исследовании крысам вводили путем в/в инъекции дозу 50 мкг/крысу, тогда как во втором исследовании крысам вводили путем в/в или п/к инъекции дозу 100 мкг/крысу (всего 500 мкг/кг; масса крыс 200 г). Повышение дозировки произошло вследствие изменения типа введения; п/к введение требует больших количеств для достижения эффекта, близкого к эффекту в/в введения.

### Анализ ФК исследования

[0597] Осуществляли количественный анализ концентрации FVII в образцах плазмы, применяя наборы для ELISA FVII человека (zymutest FVII-Biophen). Рассчитывали фармакокинетические профили, и они отражали среднее значение по 3 животным в каждый момент времени. Конечные значения периода полужизни рассчитывали, применяя программное обеспечение PK Solutions 2.0. В таблице ниже кратко описаны рассчитанные концентрации FVII в различные моменты времени взятия образцов. ФК профиль и краткое описание ФК параметров представлены в таблице ниже.

[0598] **Таблица 49.** Первое фармакокинетическое исследование (FVII-Select по сравнению с FVII-ГА) - концентрации FVII (нг/мл).

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

[0599] **Таблица 50.** Второе фармакокинетическое исследование (внутривенное введение по сравнению с подкожным) - концентрации FVII (нг/мл).

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

[0600] **Таблица 51.** ФК анализ - первое фармакокинетическое исследование (FVII-S по сравнению с ГА).

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

[0601] Добавление пяти СТР продлевало период полужизни FVII по сравнению с 3 СТР. Обе формы с 5 СТР (т.е. FVII-S и FVII-ГА) были обнаружены в далекие моменты времени (96 и 120 ч.), тогда как FVII-3 СТР-ГА и FVII-3 СТР-S были обнаружены до 72 ч. и 96 ч.,

соответственно. На основании данного факта, период полужизни FVII-5 СТР оказался большим, чем таковой у вариантов 3СТР (см. фиг. 32). Сравнение периодов полужизни всех исследованных материалов (3 и 5 СТР) в одни и те же моменты времени (8 - 72 ч.) показало, что периоды полужизни были сходными, хотя 5 СТР гораздо длиннее (фиг. 32).

[0602] **Таблица 52.** ФК анализ - второе фармакокинетическое исследование (внутривенное введение по сравнению с подкожным).

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

[0603] Вновь, как наблюдали в первом исследовании, добавление 5 СТР продлевало период полужизни FVII по сравнению с добавлением 3 СТР, причем как начальный, так и конечный период полужизни и при обоих путях введения (в/в и п/к, см. фиг. 33). Как и

ожидалось, после п/к введения FVII впервые обнаруживали в крови в более поздний момент времени по сравнению с в/в введением.

[0604] Выше были кратко описаны два ФК исследования. Основной целью первого исследования была проверка различия между FVII-3СТР и FVII-5СТР после очистки на 2 различных колонках: FVII-Select и FVII-ГА. В наших предыдущих исследованиях мы сравнивали собранные белки с очищенными белками и обнаружили, что различие между вариантами FVII с 3 и 5 СТР было больше, когда крысам вводили путем инъекции собранные белки.

[0605] Не наблюдали значимого различия между результатами FVII 3/5 СТР после очистки на обоих колонках, следовательно решили во втором исследовании инъецировать FVII 3/5 СТР-ГА.

***ПРИМЕР 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ МЫШЕЙ, ЛИШЕННЫХ FVIII, ПОСЛЕ ПОДКОЖНОЙ ИНЪЕКЦИИ FVIIA-СТР<sub>3</sub> (MOD-5014)***

**Цель исследования**

[0606] Оценить эффективность NovoSeven®, MOD-5014 (FVIIA-СТР<sub>3</sub>) и MOD-5019 (FVIIA-СТР<sub>5</sub>) в исследовании рассечения хвостовой вены, после подкожного введения.

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

**Определение количества белка на A280**

[0607] Теоретический коэффициент поглощения NovoSeven® рассчитывали, применяя алгоритм ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Расчет был основан на последовательности аминокислот. Рассчитанный коэффициент поглощения для NovoSeven® составлял 1,406, а для MOD-5019 составлял 1,075 (значения представляют поглощение 1 г/л на 280 нм). Коэффициент поглощения MOD-5014 определяли с помощью анализа аминокислот Mscan. Коэффициент поглощения для MOD-5014 составлял 1,27.

**Анализ свертывания крови FVIIa - STACLOT VIIa-rTF**

[0608] FVIIa получали путем расщепления внутри цепи одноцепочечного FVII. Нативный тканевый фактор (TF) представляет собой кофактор FVIIa, при связывании с TF, FVII опосредует активацию фактора X в Xa, при этом сам превращается в FVIIa. Растворимый тканевый фактор представляет собой внеклеточную часть нативного тканевого фактора. Он больше не может активировать FVII путем самоактивации, но FVIIa, связанный с тканевым фактором, может активировать FX в FXa.

[0609] Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF), используемый в данном анализе, специфичен к FVIIa, что используют для создания теста свертывания крови

FVIIa. Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF), в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов, вызывает свертывание плазмы без активации FVII в FVIIa.

[0610] Наблюдаемое время свертывания крови в данной системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в исследуемом образце, и не зависит от присутствия FVII в образце.

[0611] Активность FVIIa оценивали для NovoSeven® с восстановленным влажностью и для MOD-5014 и MOD-5019 перед каждым исследованием.

[0612] Удельную активность FVIIa (которую рассчитывали как активность/мл, деленную на концентрацию белка) рассчитывали на основании A280 и представили в таблице 53. При сравнении удельной активности указанных двух молекул, которые отличаются по молекулярной массе, нужно внести корректировку для того, чтобы нормировать активность (т.е. вследствие различия в молекулярной массе, количество активных сайтов в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раз больше, чем в MOD-5014, и в 1,307 раз больше, чем в MOD-5019). Следовательно, расчет переводного коэффициента представлен в следующем уравнении:

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

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

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

#### План исследования

[0613] Наиболее значимой мерой является способность белка вызывать свертывание крови *in vivo* после травматического случая. Чтобы оценить способность MOD-5014 останавливать кровотечение, использовали ту же модель мышей, лишенных FVIII, для теста с кровотечением.

[0614] Мышам, лишенным FVIII, вводили однократной подкожной инъекцией MOD-5014, MOD-5019 или NovoSeven®. Группам А и В вводили дозу NovoSeven® и MOD-5014, соответственно, в эквивалентных количествах по активности FVIIa. Группе С вводили дозу MOD-5019 в эквивалентном количестве белка FVIIa, что и в дозе MOD-5014, чтобы оценить решающий фактор (активность или количество белка). Введенные дозы составляли 4,2 мг/кг NovoSeven® и 8,6 мг/кг MOD-5014 и MOD-5019. Хвостовую вену

рассекали на расстоянии 2,7 см от кончика хвоста через 12 часов после введения, и выживаемость мышей регистрировали в течение 24 часов.

[0615] Таблица 54. Обозначение групп

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

[0616] РЕЗУЛЬТАТЫ

[0617] Результаты эксперимента кратко описаны в таблице 55 и на фигуре 34.

[0618] Таблица 55. Результаты исследования РХВ

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

[0619] Через 24 часа после РХВ, выжило лишь 11% мышей, которым ввели путем инъекции NovoSeven®. 30% мышей, которым инъецировали MOD-5014, и 40% мышей, которым инъецировали MOD-5019, выжило к данному моменту времени. Подкожная инъекция MOD-5014 и MOD-5019 привела к улучшенной выживаемости мышей по сравнению с NovoSeven®. Тем не менее, результаты не были оптимальными, поскольку более чем 50% животных погибло при проведении эксперимента.

[0620] Фактор VIIa, подобно другим факторам свертывания крови, обычно вводят путем внутривенной инъекции, для того, чтобы он попал непосредственно в кровоток. Тем не менее, в настоящем изобретении показали, что композиции, предусмотренные в настоящем тексте, неожиданно более эффективно попадают в кровоток после п/к введения. Возможность подкожного введения FVIIa дает преимущество, так как подкожное введение FVIIa обеспечивает возможность профилактического применения. Подкожные инъекции пациентам также гораздо легче вводить самим себе, и они дают преимущество, когда пациенты очень молоды и их вены малы, и их трудно обнаружить.

[0621] Следовательно, подкожное введение можно применять для профилактического лечения.

***ПРИМЕР 9. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФК-ФД РЕКОМБИНАНТНОГО  
MOD-5014 ПО СРАВНЕНИЮ С NOVOSEVEN® ПОСЛЕ ПОДКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ  
КРЫСАМ SD***

**Цели исследования**

[0622] Определить фармакокинетические и фармакодинамические параметры MOD-5014 по сравнению с доступным для приобретения rFVIIa у крыс SD после однократного п/к введения.

[0623] Сравнить два независимых эксперимента (05010 и 05034) с продуктами MOD-5014, полученными из двух различных клонов (клон № 28 по сравнению с № 61), по их фармакокинетическим параметрам.

[0624] **Экспериментальные методы**

**Животные**

[0625] 24 самца крыс SD прибыли из Harlan Laboratories Israel, Ltd, по меньшей мере за 4 дня до начала введения инъекций. Животные представляли собой здоровых молодых взрослых крыс массой ~200 г. к началу исследования. Отклонение массы тела животных к моменту начала лечения не должно было превышать  $\pm 20\%$  от средней массы каждого пола. Состояние здоровья животных, используемых в данном исследовании, изучали по прибытии. Только здоровых животных акклиматизировали к лабораторным условиям и использовали для исследования.

**Анализ свертывания крови FVIIa - STACLOT VIIa-Rtf**

[0626] Рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF), используемый в данном анализе, специфичен к FVIIa, что используют для создания теста свертывания крови FVIIa. RsTF, в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов, вызывает свертывание плазмы без активации FVII в FVIIa.

[0627] Наблюдаемое время свертывания крови в данной системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в исследуемом образце и не зависит от присутствия FVII в образце.

[0628] Активность FVIIa оценивали как для NovoSeven® после восстановления влагосодержания, так и для MOD-5014 перед каждым исследованием. Удельную активность FVIIa рассчитывали на основании A280. При сравнении удельной активности двух молекул, которые отличаются по молекулярной массе, нужно внести корректировку для того, чтобы нормировать активность (т.е. вследствие различия в молекулярной массе, количество активных сайтов в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раз больше, чем в MOD-5014).

### Программное обеспечение PK solver

[0629] Фармакокинетические параметры рассчитывали, применяя программное обеспечение PK solver. Кривую в/в введения анализировали с помощью двухкомпарментного анализа (CA) введения болюсной дозы, а затем п/к введение анализировали с помощью некомпартментного анализа (NCA) внесосудистого введения – линейно-логарифмического метода трапеций. Рассчитывали характеристики периода полужизни, AUC, клиренса и объема распределения и исследовали параметры вывода путем сравнения между экспериментальными группами.

### Экспериментальные материалы

[0630] Эксперимент № 05010:

- A. NovoSeven® RT: (партия № AU61553, получали 31.7.12\*). Концентрация FVIIa на A280: 0,86 мг/мл. Анализ активности FVIIa Staclot: 56867 ед./мг. Инъецируемая доза: **946 мкг/кг**. \*Пул аликвот NovoSeven®, все из одного и того же № партии.
- B. Клон 28. MOD-5014 RS12-001: 0,77 мг/мл\*\* на основании A280. Анализ активности FVIIa Staclot: 34162 ед./мг. Инъецируемая доза: **850 мкг FVIIa/кг**.

[0631] Эксперимент № 05034:

- A. NovoSeven® RT: (партия № AU61347, получали 1.1.13) Концентрация FVIIa на A280: 0,82 мг/мл, разбавляли до 0,4 мг/мл стерильным буфером NS. Анализ активности FVIIa Staclot: 55688 ед./мг. Инъецируемая доза: **360 мкг/кг** и **20047,7 ед./кг**.
- B. Клон 61. MOD-5014, партия 75: 1,9 мг/мл\*\* на основании A280, разбавляли до 0,89 мг/мл рецептурным буфером. Инъецируемая доза: **20047,7 ед./кг**. Свертывающая активность FVIIa: 25002\* ед./мг на основании анализа активности FVIIa Staclot.
- C. Клон 61. MOD-5014, партия 81A: 2,36 мг/мл на основании A280 (фильтровали утром в день исследования и перемеряли на 280 нм), разбавляли до 0,4 мг/мл

рецептурным буфером. Инъецируемая доза: **360 мкг FVIIa/кг**. Свертывающая активность FVIIa: 24943 ед./мг на основании анализа активности FVIIa Staclot.

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

[0632] **План исследования**

[0633] **Эксперимент № 05010**

[0634] MOD-5014 и NovoSeven® вводили однократной внутривенной или подкожной инъекцией крысам SD в дозе 0,9 мг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48 и 58 часов после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Данное исследование проводили в научном парке “Science in Action”, Нес-Циона, Израиль. Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa и проводили тщательный ФК анализ в Prolor-Biotech.

**Таблица 55. Дизайн исследования 05010**

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

[0635] **Эксперимент № 05034**

[0636] MOD-5014 и NovoSeven® вводили однократной подкожной инъекцией крысам SD в дозе 0,9 мг/кг массы тела. Образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса 3 крыс поочередно через 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48 и 72 часа после введения. Цитратную плазму (0,32%) получали незамедлительно после взятия образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Данное исследование проводили в “Science in Action”, Нес-Циона.

[0637] Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa и проводили тщательный ФК анализ в Prolor-Biotech.

**Таблица 56. Дизайн исследования 05034**

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

[0638] Осуществляли количественный анализ активности FVIIa в образцах крови, применяя набор STACLOT VIIa-rTF (Stago). Рассчитывали фармакокинетический профиль для каждого белка, и он представлял собой среднее значение по 3 животным в каждый момент времени.

[0639] **Эксперимент № 05010**

[0640] После вычитания фона: 15 мЕд./мл.

[0641] На фигуре 35 представлен ФК профиль FVIIa после в/в и п/к введения либо NovoSeven®, либо MOD-5014. Краткое описание значений активности FVIIa в каждый

момент времени представлено в таблице 57. ФК паттерны при в/в и п/к введении различаются (см. фиг. 35; после вычитания фона: 15 мЕд./мл). Стах после в/в инъекции выше, чем таковая после п/к инъекции, вследствие попадания лекарственного средства в кровь незамедлительно после введения (измеряли через 0,5 ч., таблица 57 и таблица 58). Тем не менее, после п/к введения молекулы лекарственного средства переносятся во внутриклеточный матрикс и ткани, таким образом, Стах можно измерить лишь через 2 ч. после инъекции. Общее извлечение лекарственного средства после п/к введения было меньше, чем значение Стах после в/в инъекции.

[0642] Через 8 ч. после инъекции обнаружили, что NovoSeven® обладает одинаковым ФК паттерном при введении путем либо в/в, либо п/к инъекции (после вычитания фона: 15 мЕд./мл, фиг. 35). Более того, свертывающая активность у мышей, которых лечили NovoSeven®, не детектировалась в моменты времени после 12 часов, тогда как у мышей, которых лечили MOD-5014, продолжала сохраняться измеримая активность через 58 часов после введения (таблица 57; после вычитания фона: 15 мЕд./мл; фиг. 35).

[0643] **Таблица 57.** Свертывающая активность FVIIa MOD-5014 по сравнению с NovoSeven® после в/в или п/к введения

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

После вычитания фона: 15 мЕд./мл.

[0644]

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

**A. в/в**

ФК параметры	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 (RS 12-001) (B)
Период полужизни-α (0,5)	0,24	1,04

- 4 ч.)		
Период полужизни- $\beta$ (4 - 58 ч.)	1,31	3,17
AUC 0-беск., мЕд./мл*ч.	702467,95	820778,67
Vss (Ед./кг)/(мЕд./мл)	0,13	0,13
CL ((Ед./кг)/(мЕд./мл)/ч.)	0,08	0,04
MRT (ч.)	1,74	3,62

**В. п/к**

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

Vz/F - объем распределения в конечной фазе

**Эксперимент № 05034**

[0645] На фигуре 36 представлен ФК профиль FVII после п/к введения либо NovoSeven®, либо MOD-5017. Исследовали две различные партии клона номер 61 (№75 и №81) в одной и той же концентрации или с одними и теми же единицами активности, по сравнению с NovoSeven®. Краткое описание значений активности FVIIa в каждый момент времени представлено в таблице 59.

[0646] Результаты свидетельствуют о близком ФК паттерне после п/к введения, соответствующем предыдущим экспериментам. Более того, свертывающая активность у мышей, которых лечили NovoSeven®, не детектировалась в моменты времени после 12 часов, тогда как у мышей, которых лечили MOD-5014, продолжала сохраняться измеримая активность через 24 часа после введения (таблица 59 и фигура 36; и после вычитания фона: 56 мЕд./мл (8, 12 ч.) или 32 мЕд./мл (0,5, 2, 6, 14 ч.)).

[0647] Значения С<sub>max</sub> партии №81 (D) клона номер 61 (1301 мЕд./мл) были ниже, чем значения С<sub>max</sub> партии №75 (B) клона номер 61 и NovoSeven® (A) (3521 мЕд./мл и 5908 мЕд./мл, соответственно), хотя их всех вводили путем инъекции в одном и том же количестве единиц активности (таблица 6). Тем не менее, у партий №75 (B) и №81 (D) наблюдалась почти одинаковая активность (559 мЕд./мл и 478 мЕд./мл, соответственно), которую измеряли через 8 ч. после инъекции (фигура 36 и таблица 59; и после вычитания фона: 56 мЕд./мл (8, 12 ч.) или 32 мЕд./мл (0,5, 2, 6, 14 ч.)).

[0648] **Таблица 59.** Свертывающая активность FVIIa MOD-5014 (клон 61, партии №75, №81) по сравнению с NovoSeven® после однократного п/к введения.

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

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

[0649] **Таблица 60.** ФК параметры MOD-5014 (клон 61, партии №75, №81) по сравнению с NovoSeven® после однократного п/к введения.

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

[0650] В настоящей заявке кратко описаны два ФК исследования: 05010 и 05034. Нашей целью было дать определенное представление о влиянии присоединения СТР к FVII на период полужизни и клиренс белка при подкожном введении, а также исследовать его удельную активность после данной модификации. В данных исследованиях крысам SD вводили путем однократной п/к инъекции MOD-5014, полученный из двух клонов, и двух различных партий, и сравнивали с рекомбинантным доступным для приобретения FVIIa (NovoSeven®). Указанные компоненты вводили путем инъекции в сходных концентрациях FVIIa (мкг/кг) или на одном и том же уровне активности (ед./кг), и осуществляли анализ на основе ФК активности.

[0651] Основной целью первого исследования было сверить различные ФК параметры после в/в и п/к введения. На основании данного исследования мы можем заключить, что существует различие между ФК паттерном, измеренным после в/в или п/к введения.  $T^{1/2}$  после п/к инъекции MOD-5014 составлял 7,78 ч., и лишь 4,2 ч. после в/в инъекции. Значения AUC были одинаковы (таблица 58).

[0652] Во втором исследовании, тем не менее, сосредоточились на различиях между двумя партиями MOD-5014 клона номер 61, который вводили путем инъекции в одной и той же концентрации FVIIa или в равных единицах активности, и сравнивали с NovoSeven®. В данном исследовании мы показали, что клон 61 партии №75 проявил лучшие ФК параметры, чем партии №81. У партии №81, которую вводили путем инъекции на одном и том же уровне активности,  $St_{max}$  оказалась ниже по неизвестной причине. Более того, намеряли одинаковую  $St_{max}$ , когда вводили путем инъекции клон 61 партии №81 в двух различных дозах (по концентрации FVIIa или по единицам активности), вместо 2,5-кратного различия между двумя значениями активности. После совместного анализа обоих исследований, мы можем прийти к заключению, что клон 28 проявил больший параметр  $t^{1/2}$ , чем клон 61 №75 (лучшая партия) после п/к инъекции (7,78 ч. и 5,7 ч., соответственно, таблица 60). Мы также можем прийти к заключению, что образцы в разные моменты времени дают различные ФК паттерны, что приводит к изменению ФК кривых. Паттерны указанных кривых могут нам дать большее представление о поведении лекарственного средства в крови. Следовательно, мы решили установить моменты времени, аналогичные таковым, обнаруженным в Baxter (0, 0,5, 2, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72 ч.). Более того, концентрация FVIIa в эксперименте 05010 была слишком высокой, и ее заново измерили в следующем эксперименте (05034) с п/к введением. Для будущих ФК исследований, мы решили вводить путем инъекции компонент в дозе 360 мкг FVIIa/кг.

[0653] В общей сложности, мы можем больше узнать о продукте MOD-5014 после п/к введения, чтобы определить клон и партию с наилучшим качеством и чтобы выявить наилучший способ определения количества инъекцируемого MOD-5014 - по концентрации или единицам активности FVIIa.

[0654] Хотя о свойства настоящего изобретения были проиллюстрированы и описаны в настоящем тексте, средние специалисты в данной области теперь смогут придумать множество его модификаций, замен, изменений и эквивалентов. Следовательно, должно быть очевидно, что в объем прилагаемой формулы изобретения должны входить все такие модификации и изменения как явно входящие в объем настоящего изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Применение модифицированного карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина фактора свертывания крови, состоящего из фактора свертывания крови и трех СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, и при этом указанный модифицированный СТР фактор свертывания крови представляет собой:

а) СТР-модифицированный полипептид Фактора IX (FIX), состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или аминокислот 47-545 SEQ ID NO: 31,

б) СТР-модифицированный полипептид Фактора VII (FVII), состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 или аминокислот 39-528 SEQ ID NO: 25, или

в) СТР-модифицированный полипептид активированного фактора VII (FVIIa), состоящий из аминокислотной последовательности аминокислот 39-528 SEQ ID NO: 25;

в улучшении исполнительности пациента при терапии фактором свертывания крови у субъекта-человека.

2. Применение по п. 1, в котором указанная терапия фактором свертывания крови подходит для лечения гемофилии или гемофилии А.

3. Применение по любому из п.п. 1 или 2, в котором указанное повышение исполнительности пациента уменьшает частоту введения указанного полипептида фактора свертывания крови при терапии фактором свертывания крови по сравнению с немодифицированным фактором свертывания крови.

4. Применение модифицированного карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина фактора свертывания крови, состоящего из фактора свертывания крови и трех СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, и при этом указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови представляет собой:

а) СТР-модифицированный полипептид Фактора IX (FIX), состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или аминокислот 47-545 SEQ ID NO: 31,

б) СТР-модифицированный полипептид Фактора VII (FVII), состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 или аминокислот 39-528 SEQ ID NO: 25, или

в) СТР-модифицированный полипептид активированного фактора VII (FVIIa), состоящий из аминокислотной последовательности аминокислот 39-528 SEQ ID NO: 25;

в лечении гемофилии А у субъекта-человека.

5. Применение по любому из п.п.1-4, в котором по меньшей мере один из указанных присоединенных СТР гликозилирован.

6. Применение по любому из п.п. 1-5, в котором один СТР присоединен к указанному фактору свертывания крови посредством линкера.

7. Применение по п. 6, в котором указанный линкер представляет собой пептидную связь.

8. Применение по любому из п.п. 1-7, в котором указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови представляет собой СТР-модифицированный полипептид FIX, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или аминокислот 47-545 SEQ ID NO: 31.

9. Применение по любому из п.п. 1-7, в котором указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови представляет собой СТР-модифицированный полипептид FVII, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 или аминокислот 39-528 SEQ ID NO: 25.

10. Применение по любому из п.п. 1-7, в котором указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови представляет собой СТР-модифицированный полипептид FVIIa, состоящий из аминокислотной последовательности аминокислот 39-528 SEQ ID NO: 25.

11. Применение по любому из п.п. 1-10, в котором указанный модифицированный СТР фактор свертывания крови подходит для введения субъекту в форме фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

12. Применение по любому из п.п. 1-11, в котором указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови подходит для подкожного введения.

13. Применение по любому из п.п. 1-11, в котором указанный модифицированный СТР фактор свертывания крови подходит для внутривенного введения.

14. Применение по любому из п.п. 1-13, в котором указанный субъект является гемофильным субъектом или субъектом, страдающим дефицитом витамина К или заболеванием печени.

15. Применение по любому из п.п. 1-14, в котором указанный субъект является ребенком.

16. Применение по любому из п.п.1-15, в котором указанный модифицированный СТР фактор свертывания крови подходит для введения один раз в неделю.

17. Применение по любому из п.п. 1-16, в котором указанный полипептид СТР-модифицированного активированного фактора VII (FVIIa) содержит легкую цепь и тяжелую цепь, соединенные дисульфидной связью.

18. Применение по п. 17, в котором указанная легкая цепь и тяжелая цепь соединены в аргинине 152 SEQ ID NO: 25.

19. Применение по любому из п.п. 17-18, в котором разделение указанной легкой цепи и указанной тяжелой цепи в геле SDS-PAGE происходит в условиях денатурации, и в котором указанная легкая цепь мигрирует при молекулярной массе 25 кДа, а указанная тяжелая цепь мигрирует при молекулярной массе 50 кДа.

20. Модифицированный карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина полипептид фактора свертывания крови VII (FVII), состоящий из активированного фактора свертывания крови FVII (FVIIa) и трех СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, где указанный СТР-модифицированный полипептид FVIIa имеет аминокислотную последовательность, указанную в аминокислотах 39-528 SEQ ID NO: 25, в котором полипептид СТР-модифицированного активированного FVIIa содержит легкую цепь и тяжелую цепь, соединенные дисульфидной связью.

21. Модифицированный СТР полипептид фактора свертывания крови FVIIa по п. 20, в котором указанная легкая цепь и тяжелая цепь соединены в аргинине 152 SEQ ID NO: 25.

22. Модифицированный СТР полипептид фактора свертывания крови FVIIa по любому из п.п. 20-21, в котором разделение указанной легкой цепи и указанной тяжелой цепи в геле SDS-PAGE происходит в денатурирующих условиях, и в котором указанная легкая цепь мигрирует при молекулярной массе 25 кДа, а указанная тяжелая цепь мигрирует при молекулярной массе 50 кДа.

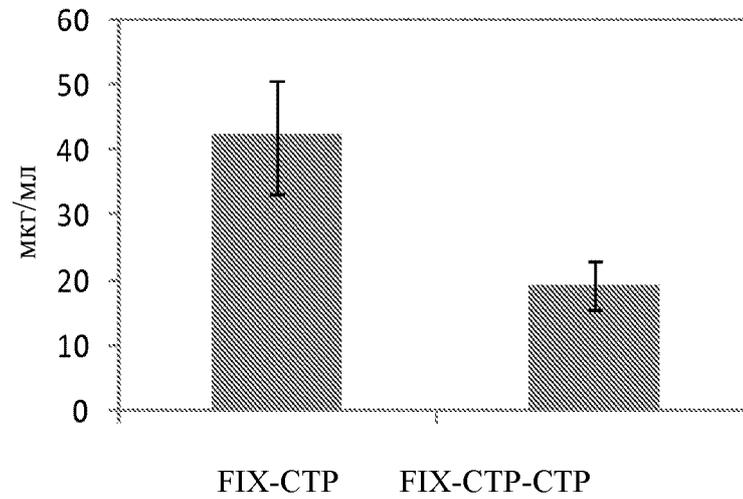
23. Модифицированный СТР полипептид фактора свертывания крови FVIIa по любому из п.п. 20-22, в котором по меньшей мере один СТР гликозилирован.

По доверенности

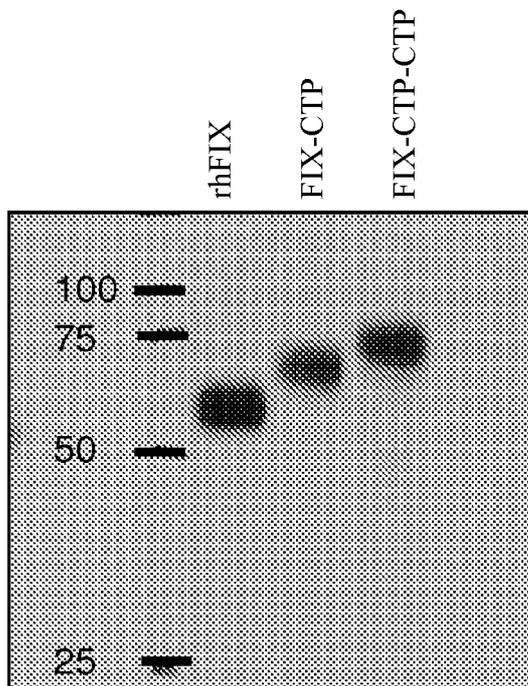
## Фигура 1

## Уровень АГ собранного фактора IX – ELISA

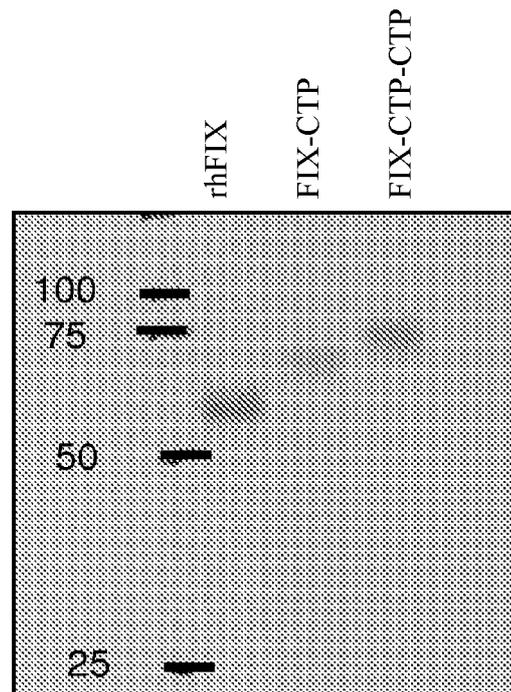
Фигура 1А



Фигура 1В

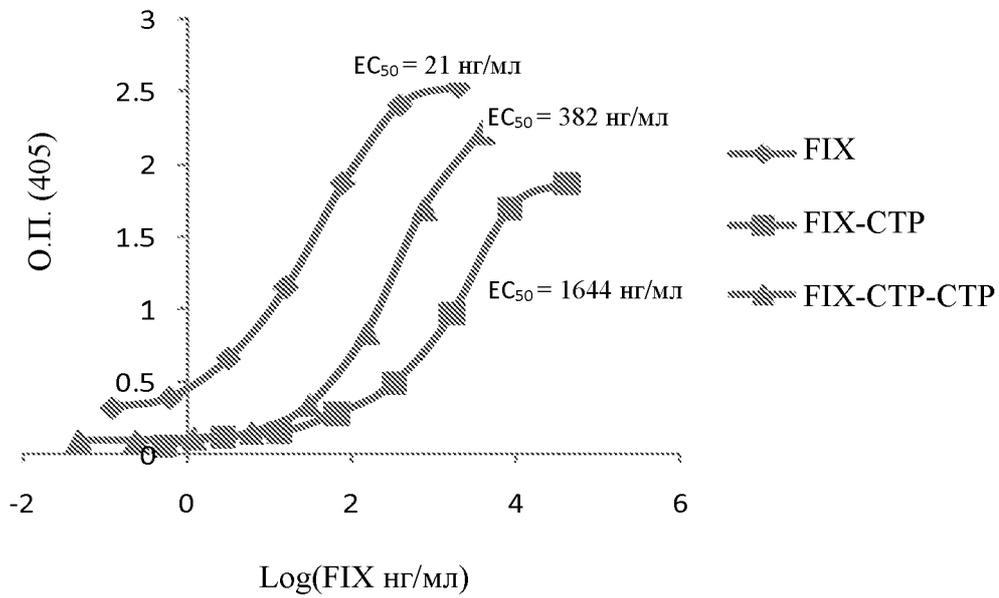
Вестерн-блот: АГ к FIX  
100 нг (собранных)

Фигура 1С

Вестерн-блот: АГ,  
распознающие гамма-  
карбоксилирование

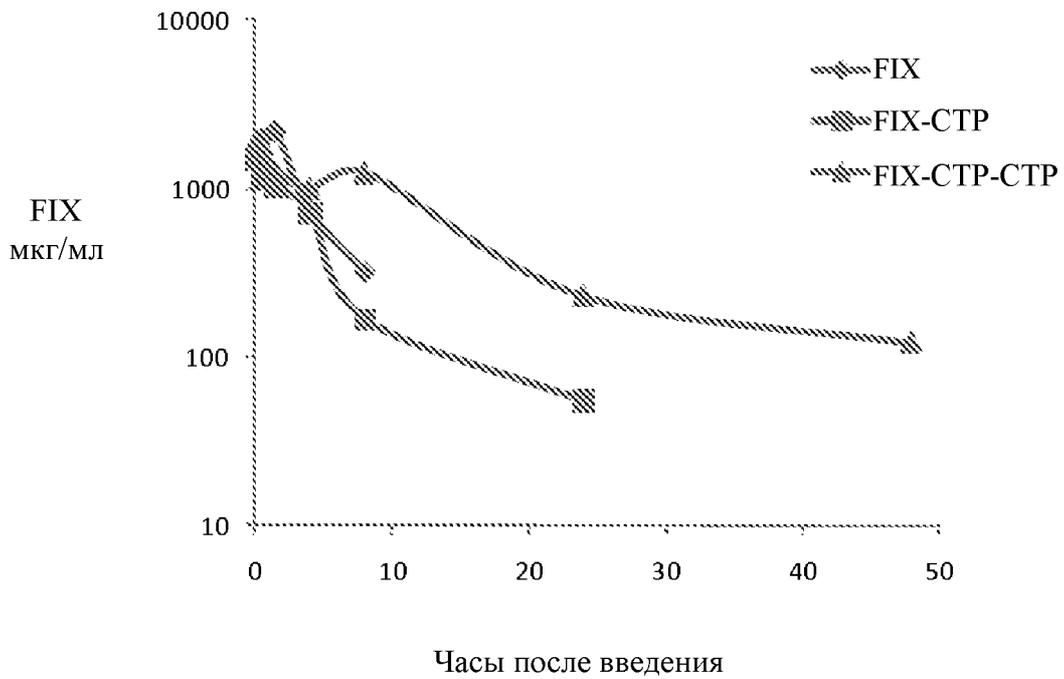
Фигура 2

## Хромогенная активность собранного фактора IX



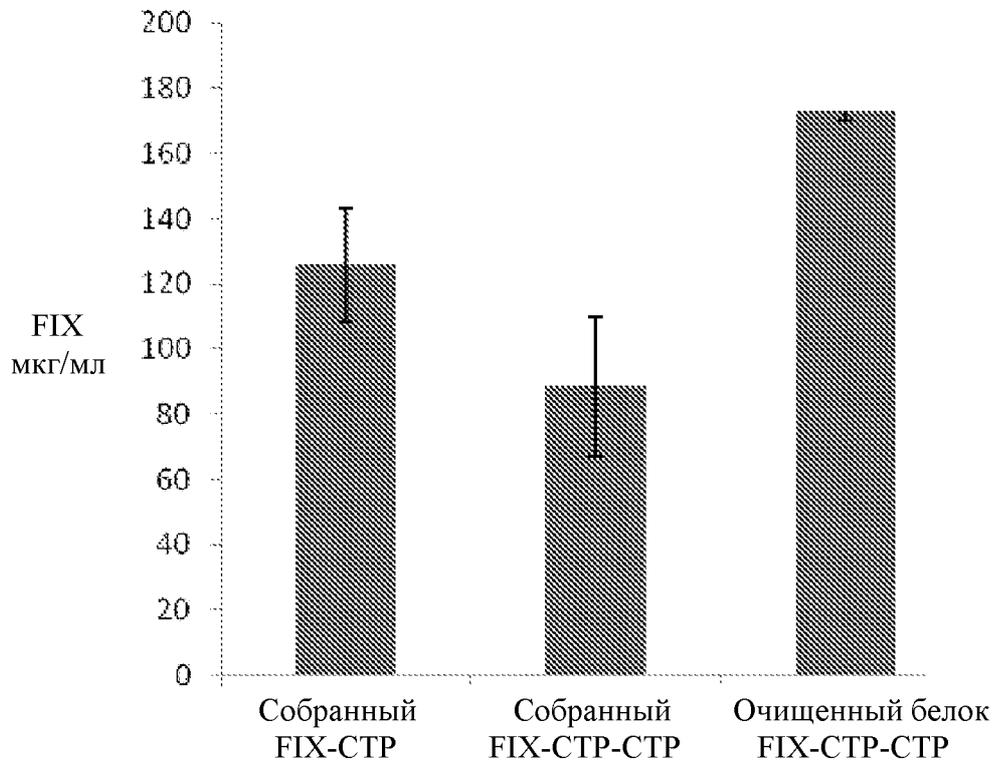
Фигура 3

## ФК профиль рекомбинантного FIX

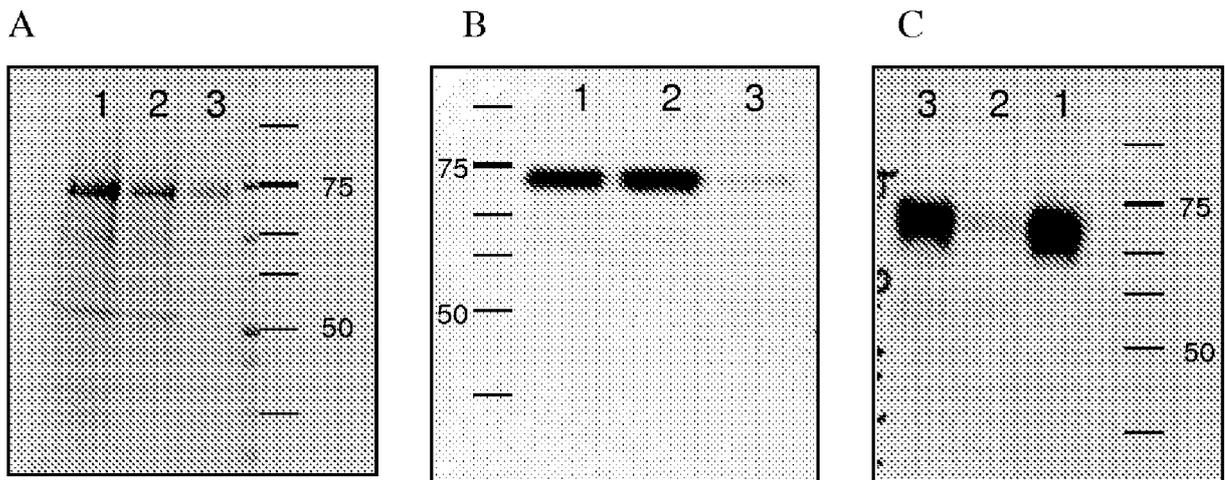


Фигура 4

## Уровень антигена FIX



Фигура 5



Кумасси, ПААГ/ДСН

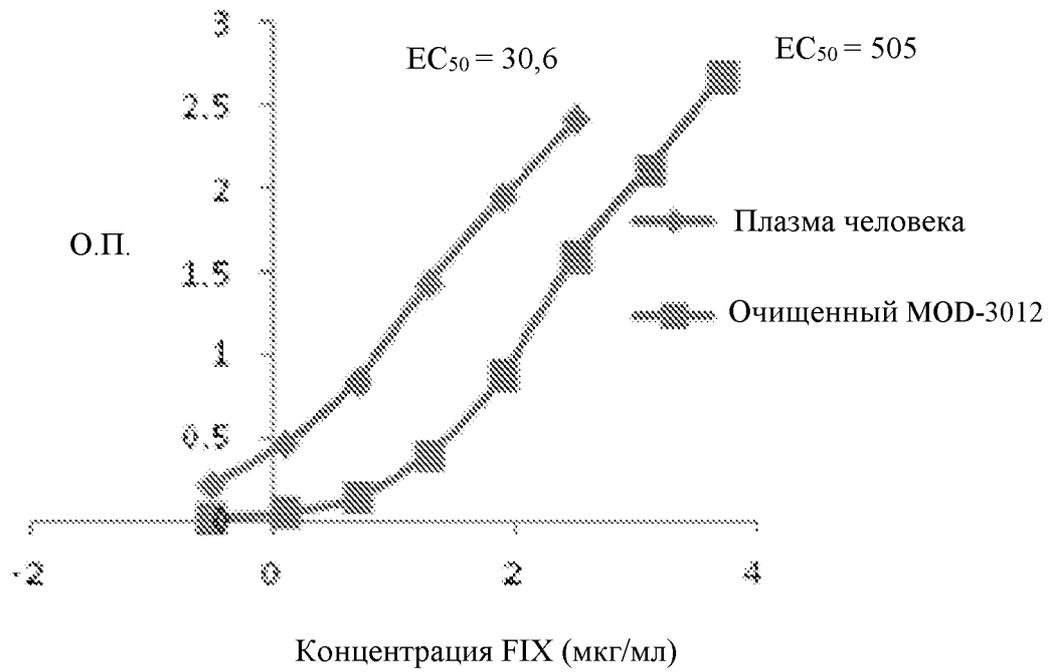
Вестерн-блот: АТ к FIX

Вестерн-блот: АТ,  
распознающие гамма-  
карбоксилирование

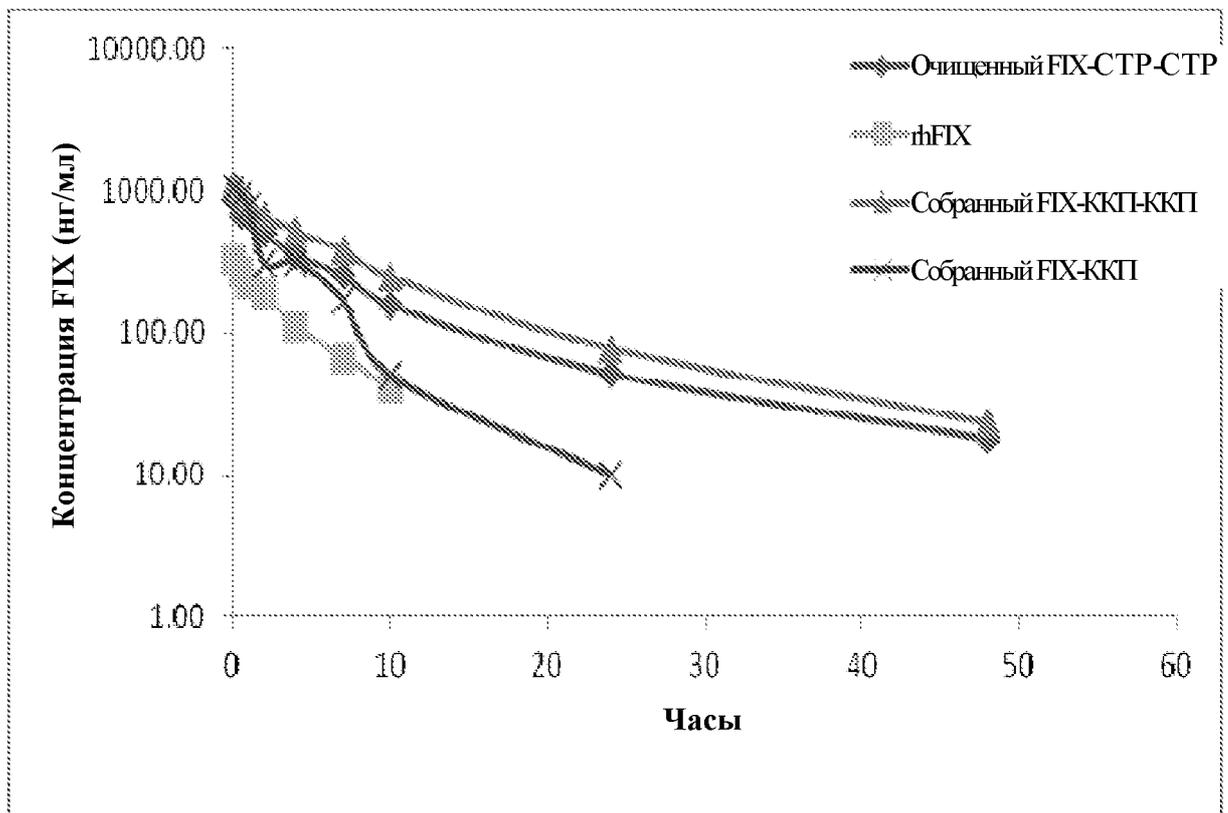
1 – Собранный FIX-(СТР) <sub>2</sub>
2 – Несвязанный
3 – Конц. элюат (MOD3012)

Фигура 6

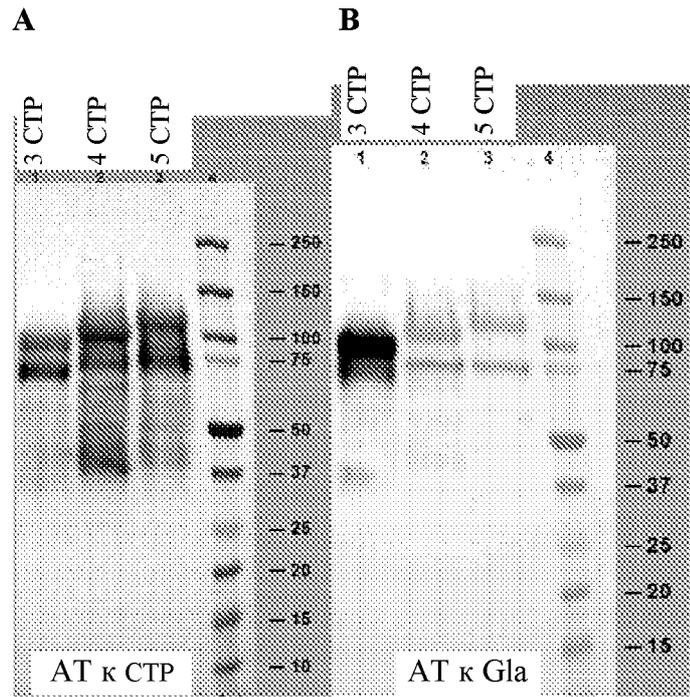
## Хромогенная активность фактора IX



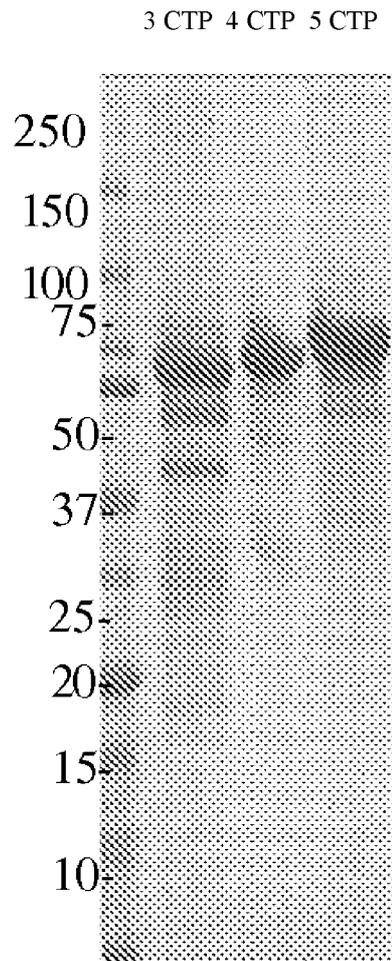
Фигура 7



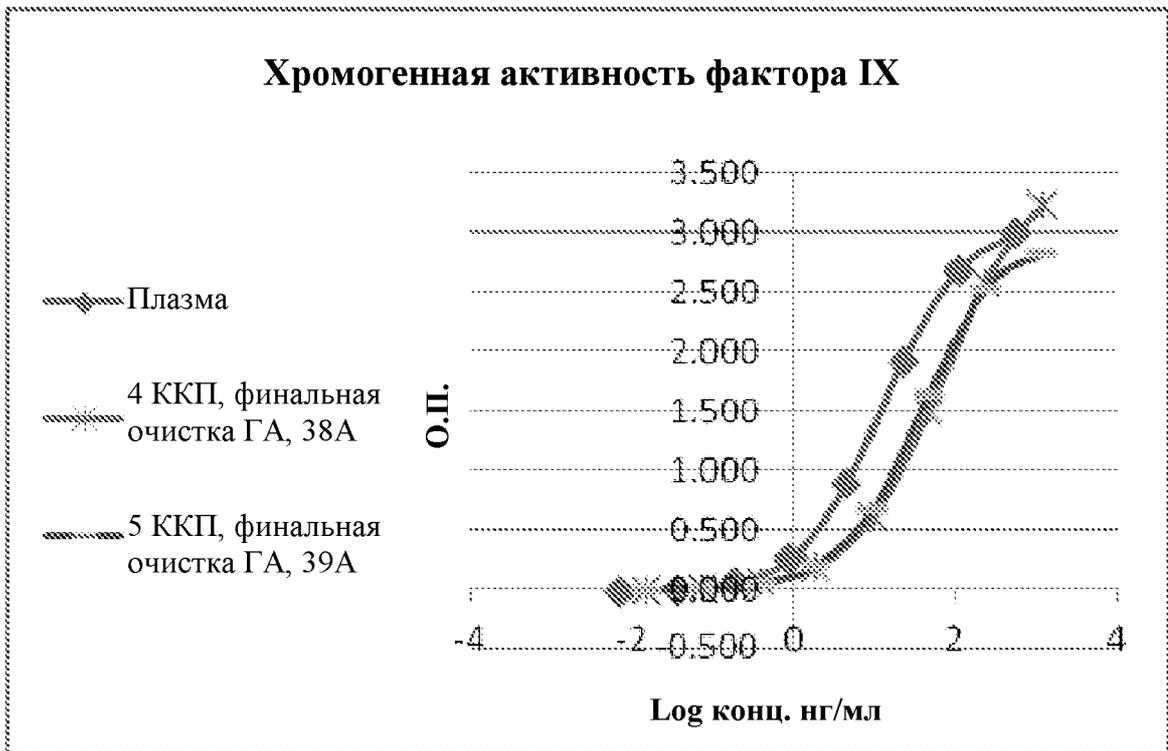
Фигура 8



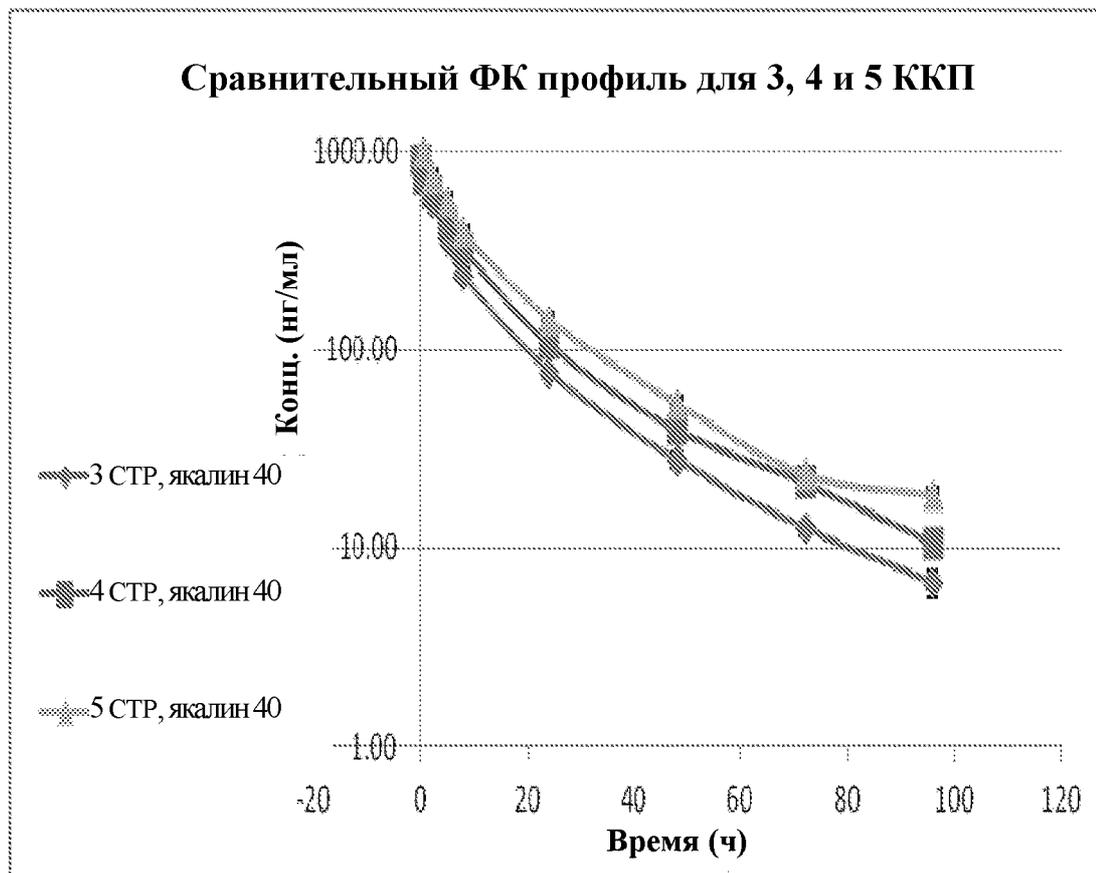
Фигура 9



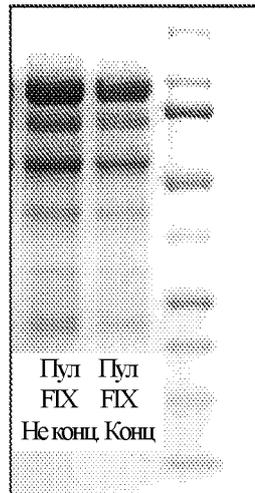
Фигура 10



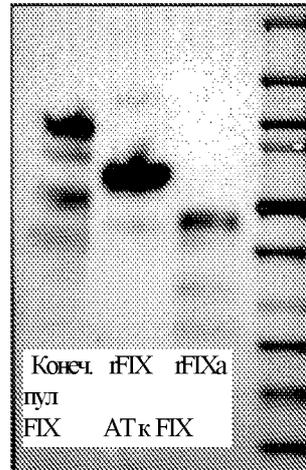
Фигура 11



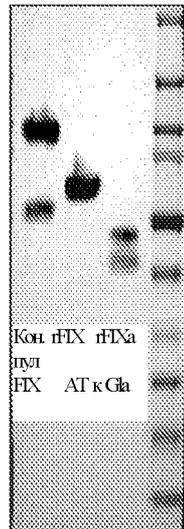
Фигура 12



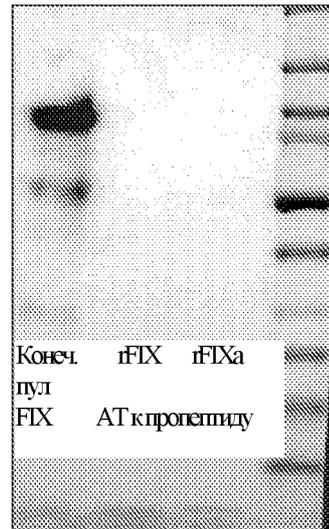
Фигура 12А



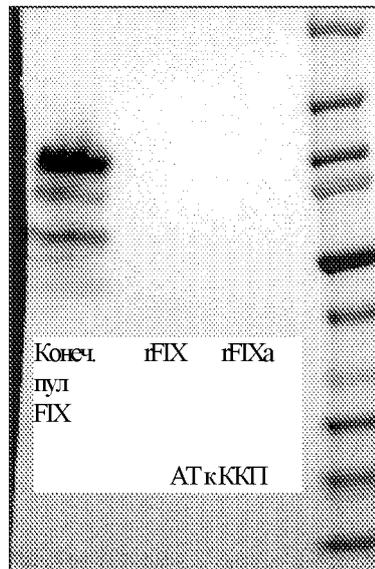
Фигура 12В



Фигура 12С

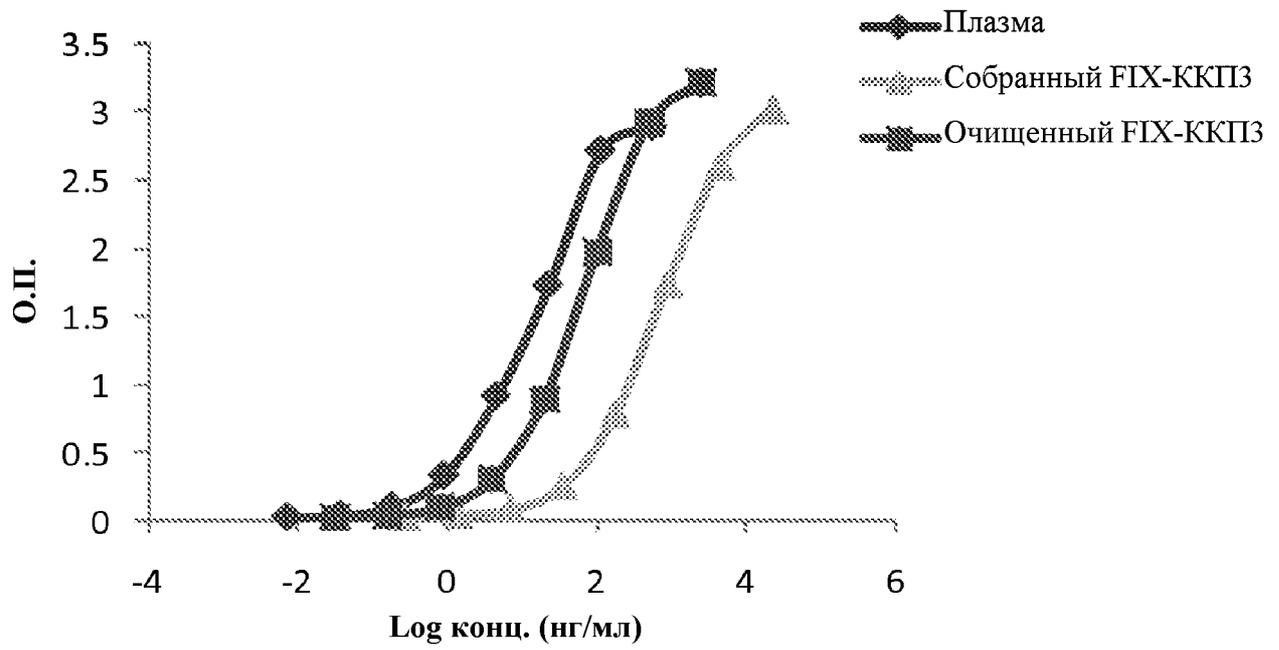


Фигура 12D

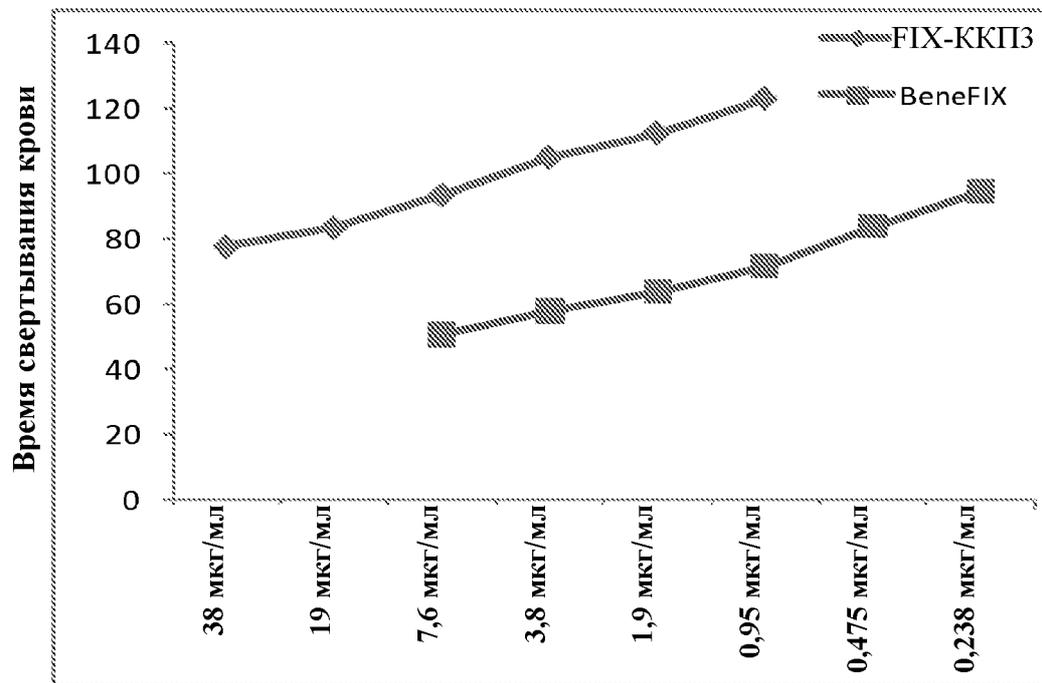


Фигура 12Е

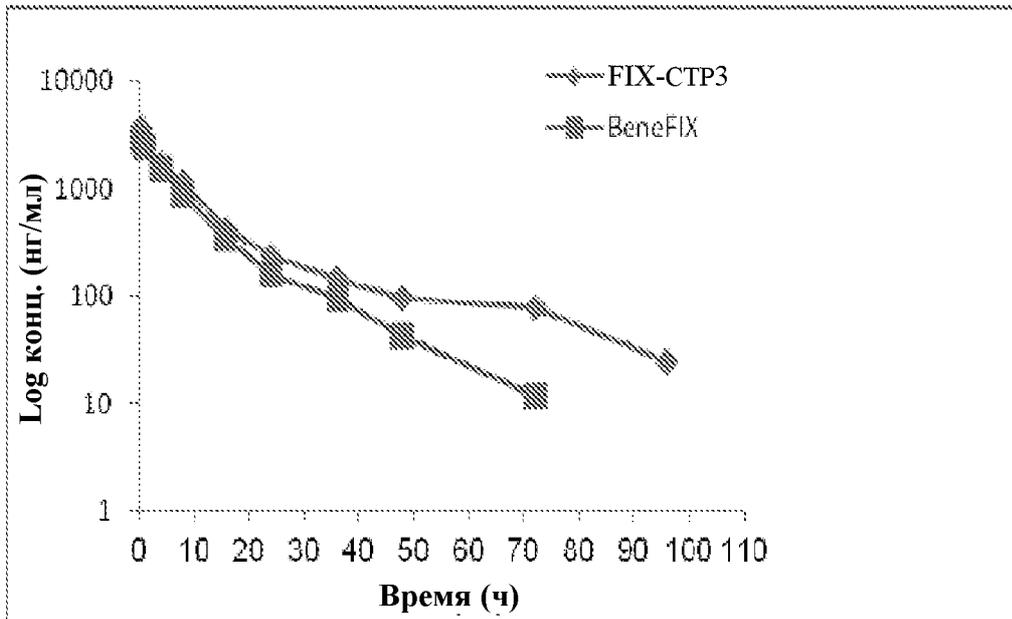
Фигура 13



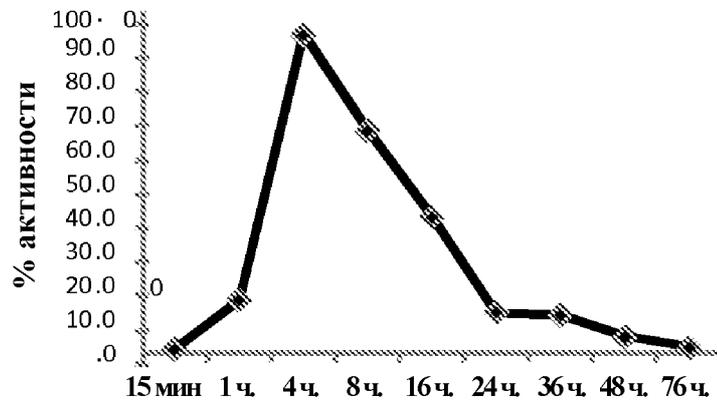
Фигура 14



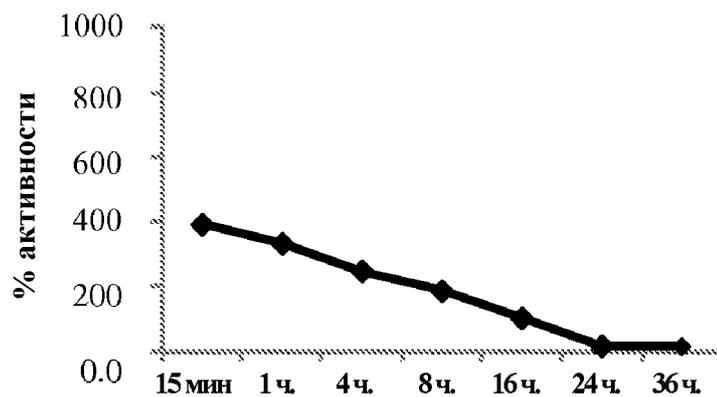
Фигура 15



Фигура 16А



Фигура 16В



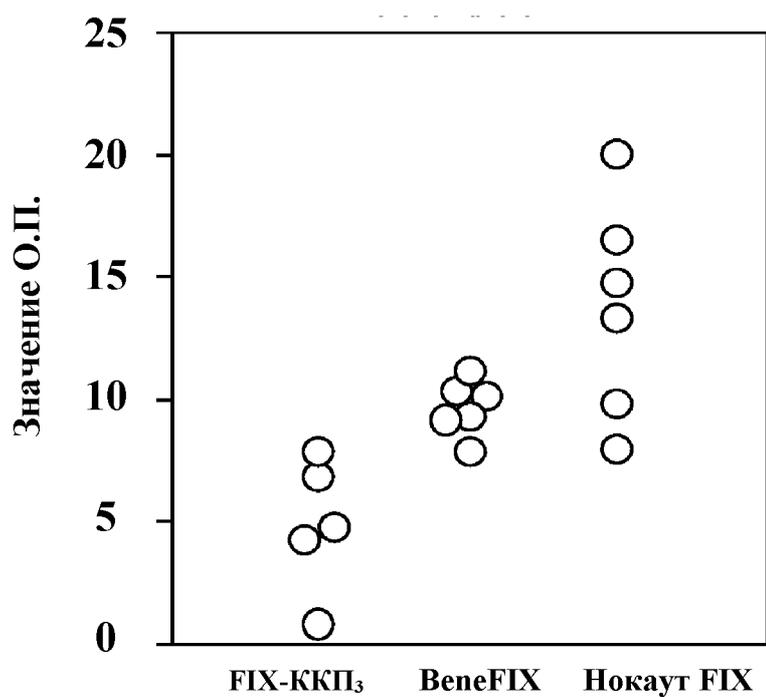
Фигура 17А

Первый тест с кровотечением: значение О.П. гемоглобина

№	FIX-СТР3	BeneFIX	Нокаут FIX
1	6,84	10,26	19,92
2	0,72	10,14	13,32
3	4,68	11,16	16,38
4	НД	9,18	7,92
5	7,86	7,77	9,72
6	4,14	9,15	14,7

Фигура 17В

Первое кровотечение



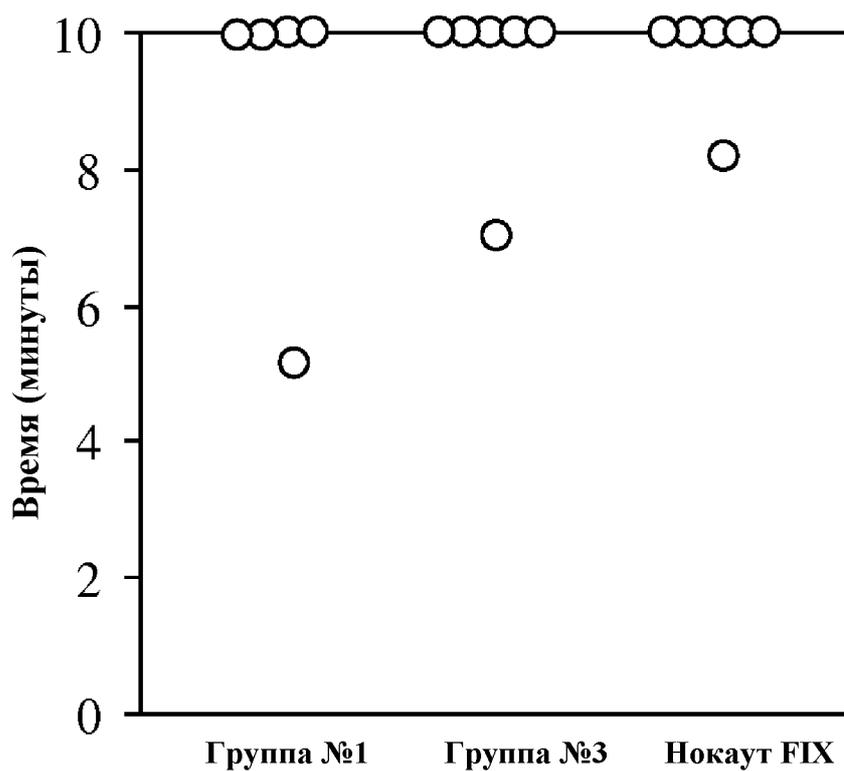
Фигура 17С

Время первого кровотечения (мин.)

№	Группа №1	Группа №3	Нокаут FIX
1	10	10	10
2	5,12	10	8,17
3	10	10	10
4		10	10
5	10	7	10
6	10	10	10

Фигура 17D

Первое кровотечение



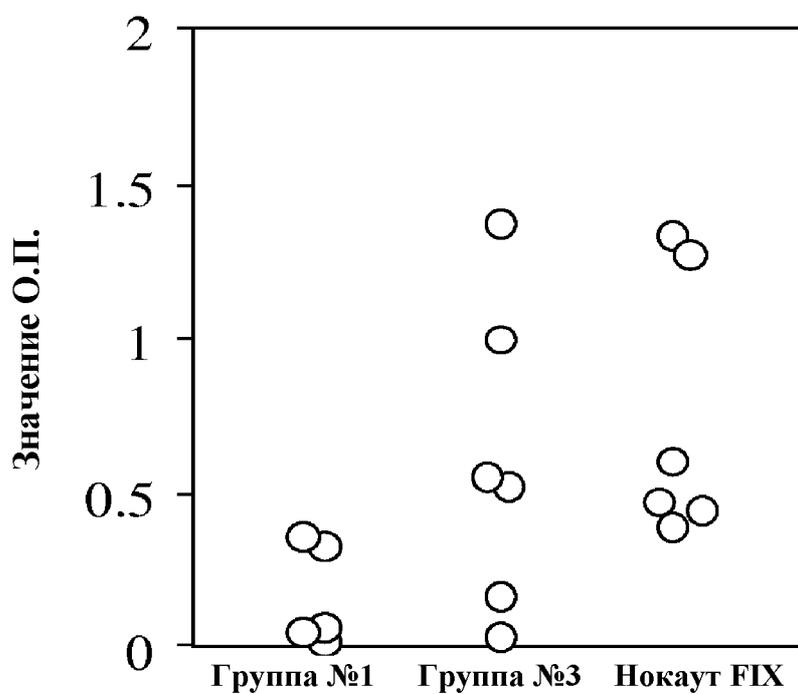
Фигура 18А

Второе кровотечение: значение О.П.

№	FIX-СТР3	BeneFIX	Нокаут FIX
1	0,324	1,368	1,32
2	0,358	0,516	0,43
3	0,006	0,548	0,6
4		0,027	1,26
5	0,064	0,158	0,46
6	0,045	0,992	0,384

Фигура 18В

Второе кровотечение



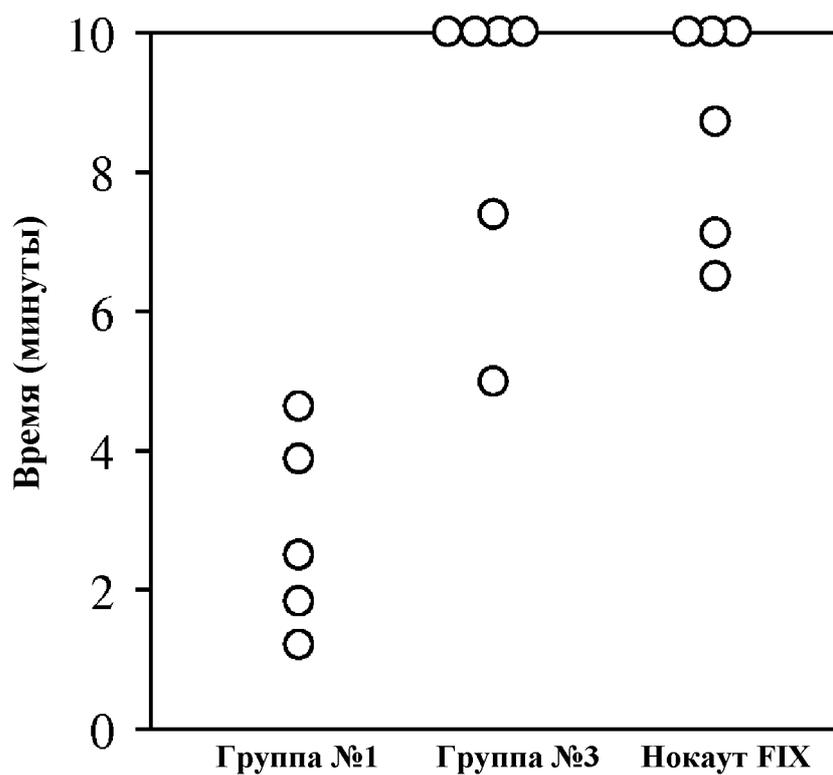
Фигура 18С

**Время второго кровотечения (мин.)**

№	Группа №1	Группа №3	Нокаут FIX
1	4,63	10	10
2	2,5	10	8,7
3	1,2	10	7,13
4		5	10
5	3,87	7,4	10
6	1,83	10	6,5

Фигура 18D

**Второе кровотечение**



**Фигура 19**

**Фигура 19А**



**Фигура 19В**



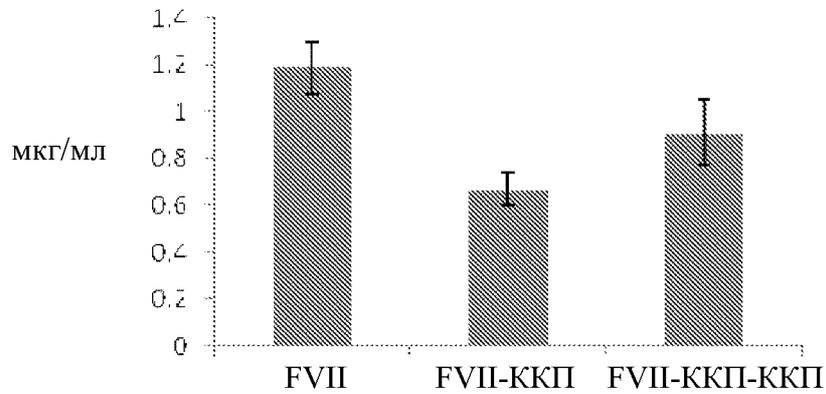
**Фигура 19С**



**Фигура 19D**

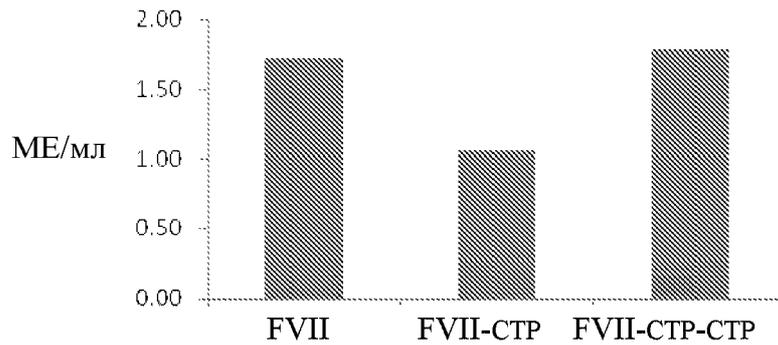
**Фигура 20А**

**Уровень антигена rFVII**



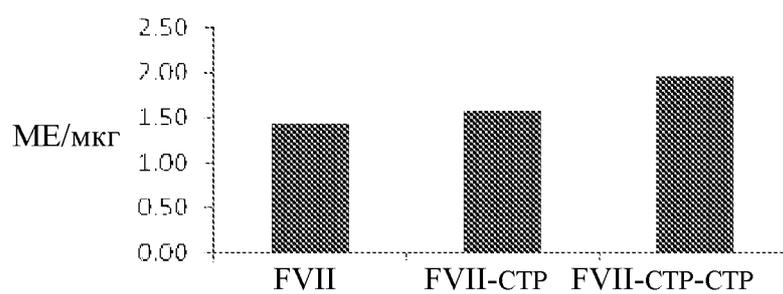
**Фигура 20В**

**Хромогенная активность rFVII**



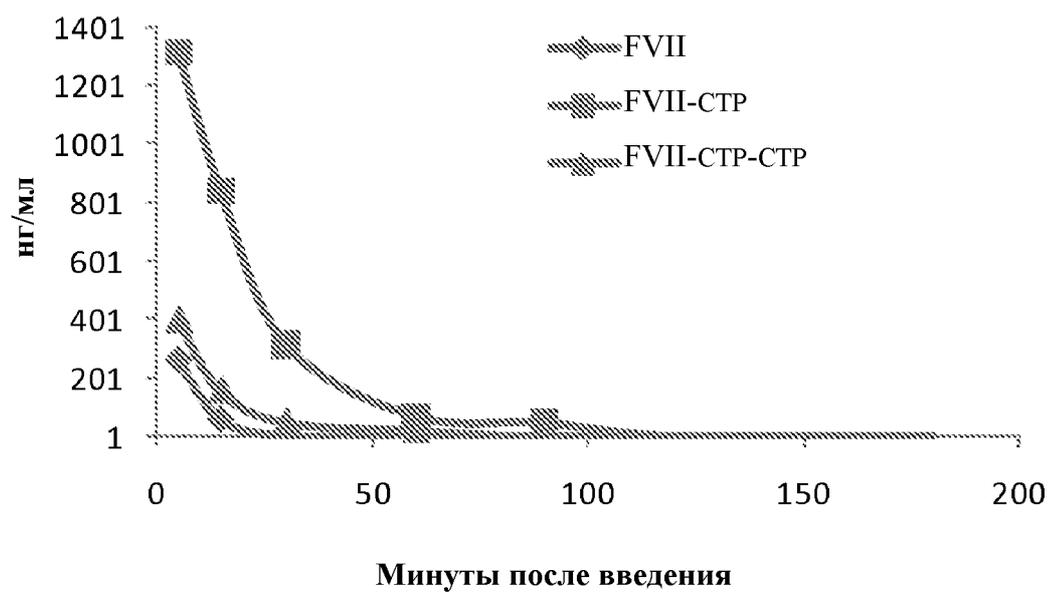
Фигура 20С

## Удельная активность FVII

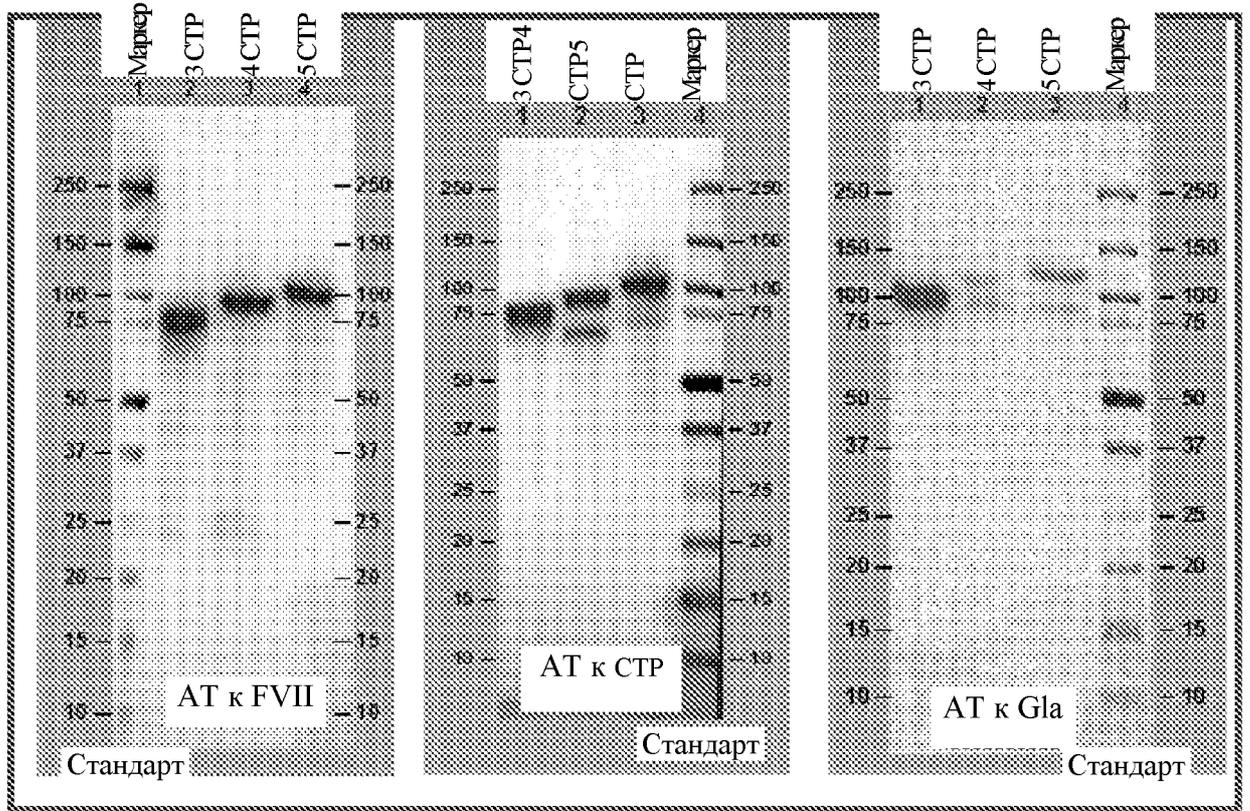


Фигура 20D

## ФК профиль FVII



Фигура 21

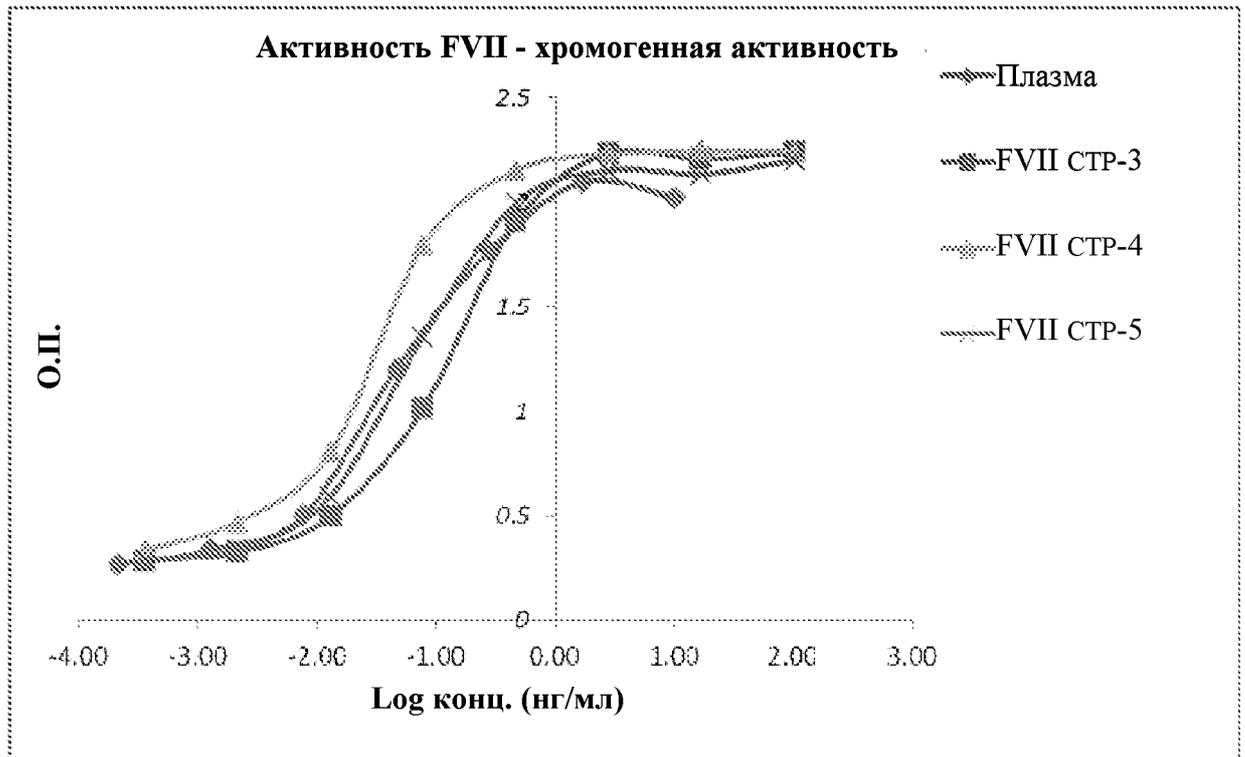


Фигура 21А

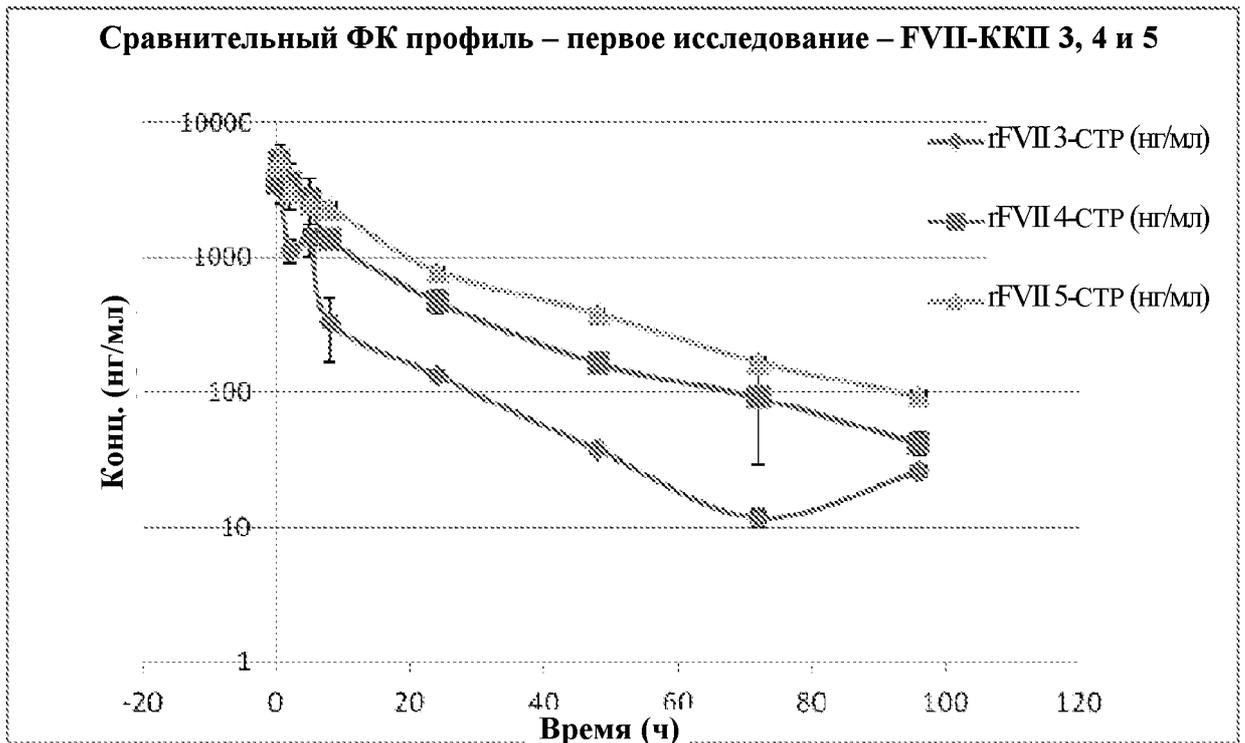
Фигура 21В

Фигура 21С

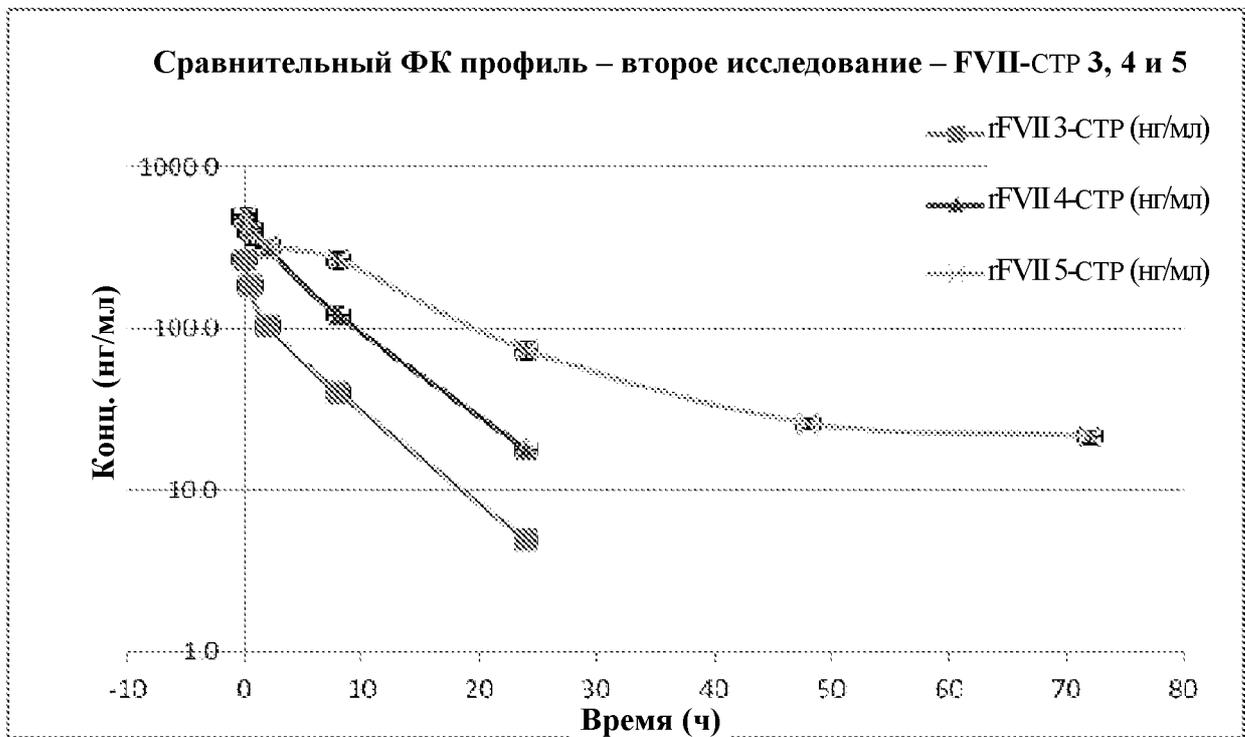
Фигура 22



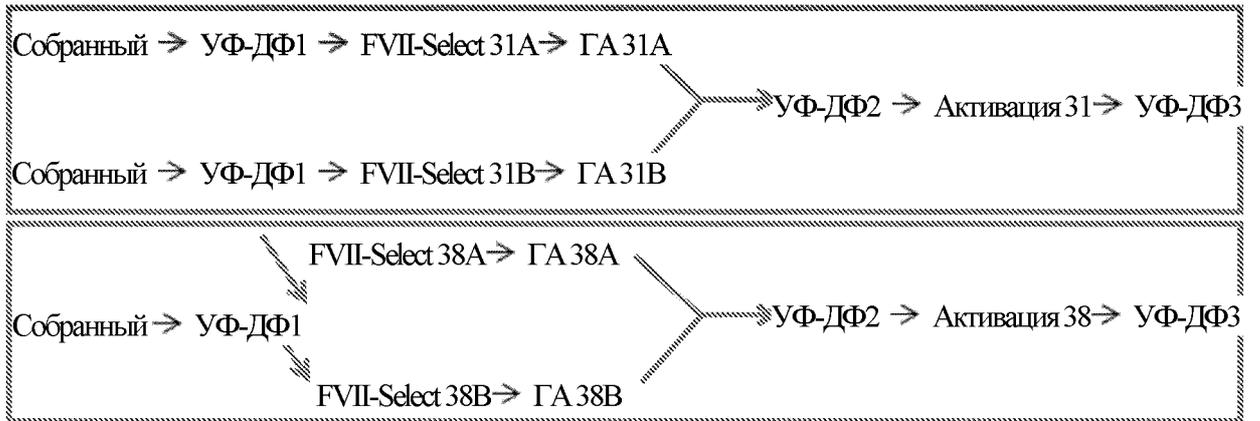
Фигура 23



Фигура 24



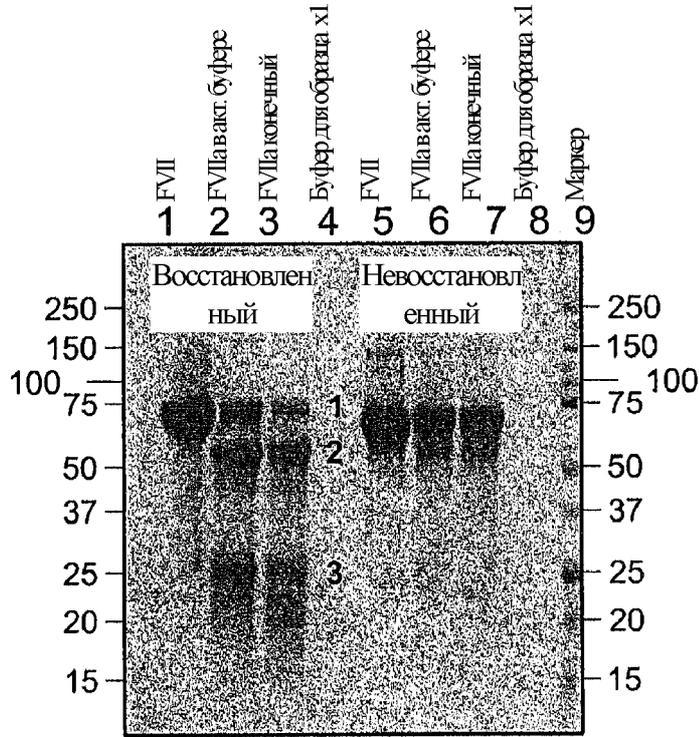
Фигура 25А



Фигура 25В

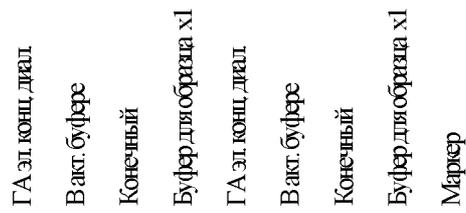
### Фигура 26А

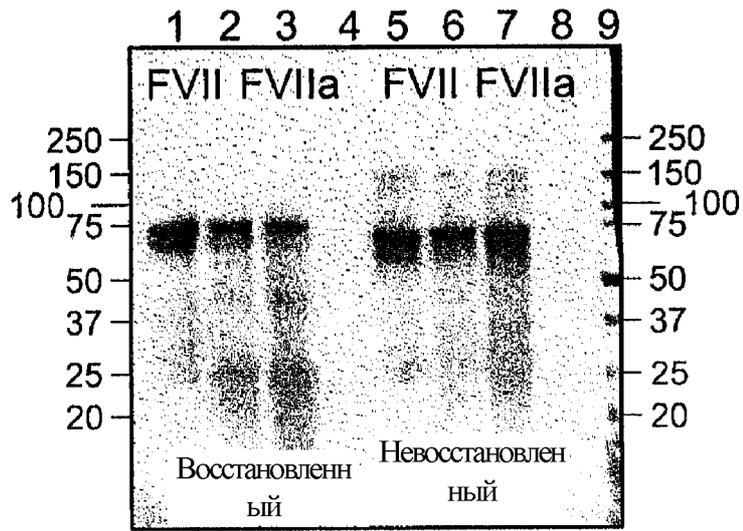
Активация FVII, партия 31



Стандарт

### Фигура 26В

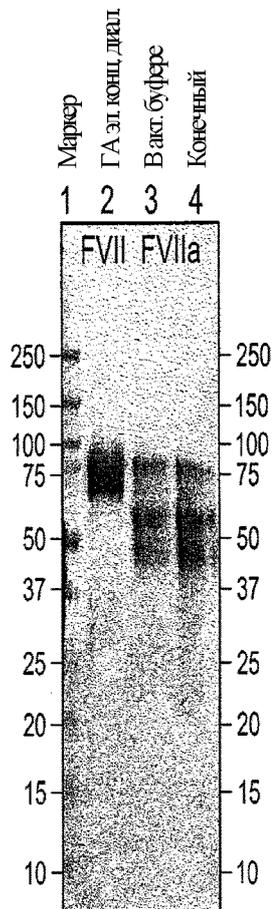




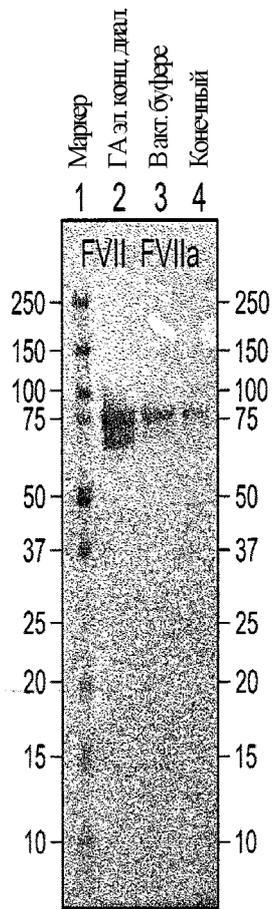
FVII, партия 31, конечные, вестерн-блот с АТ к FVII

Фигура 26С

Фигура 26D

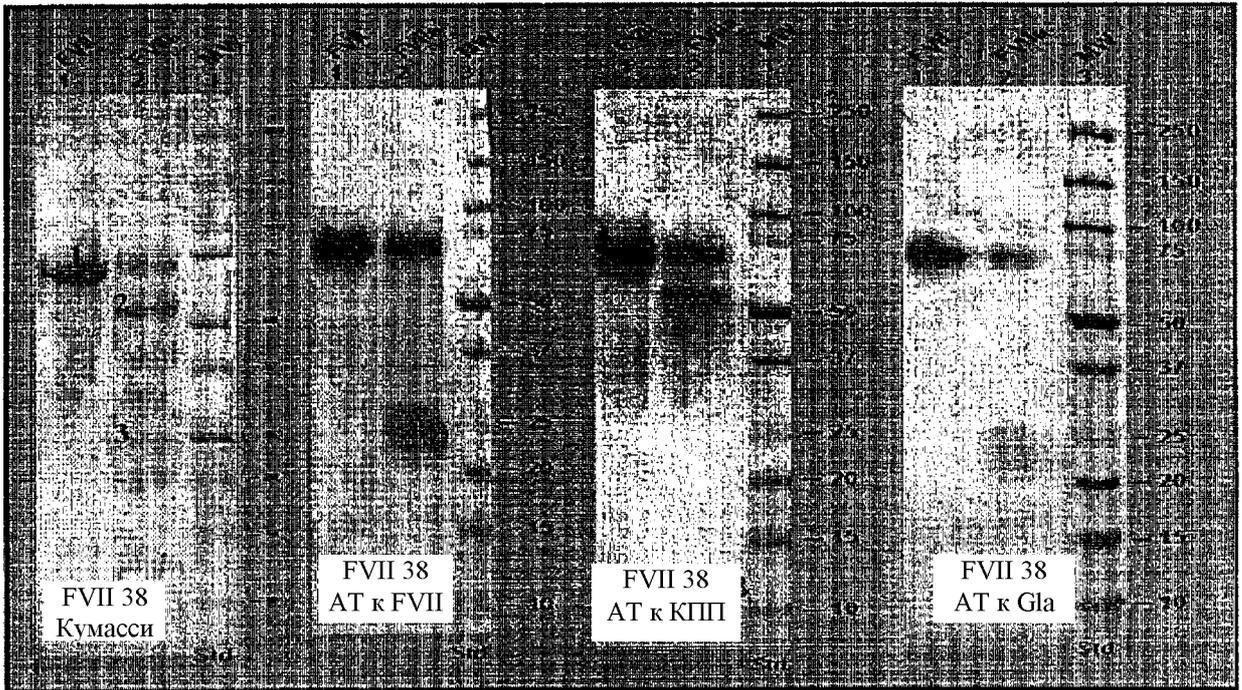


FVII, партия 31, конечные  
Восстановленный  
Вестерн-блот с АТ к СТР



FVII, партия 31, конечные  
Восстановленный  
Вестерн-блот с АТ к СТР

Фигура 26



Фигура 26E

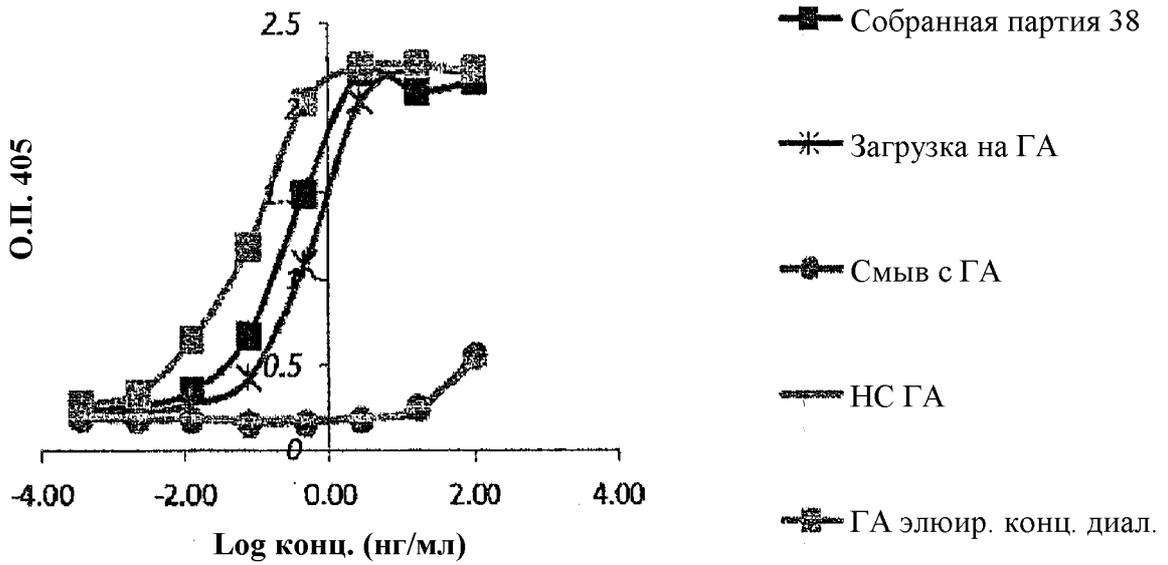
Фигура 26 F

Фигура 26G

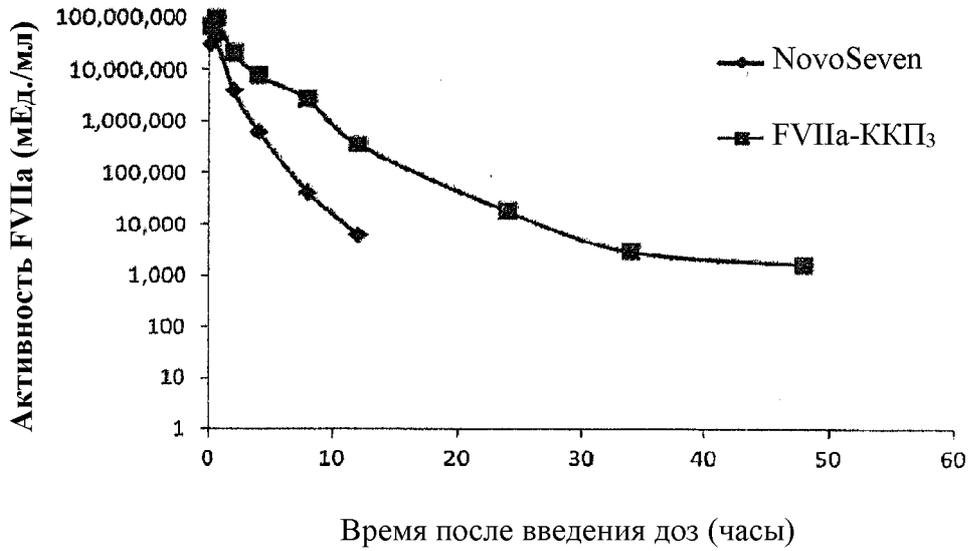
Фигура 26H

Фигура 27

Хромогенная активность FVII, партия 38

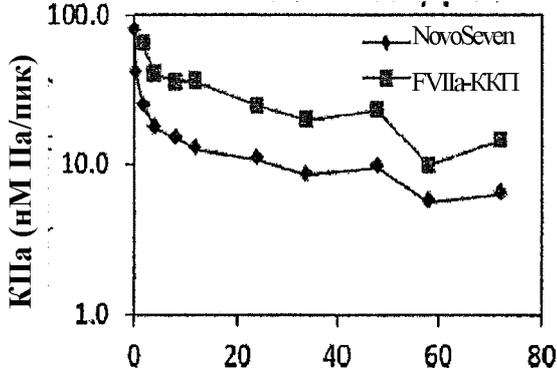


Фигура 28



Фигура 29А

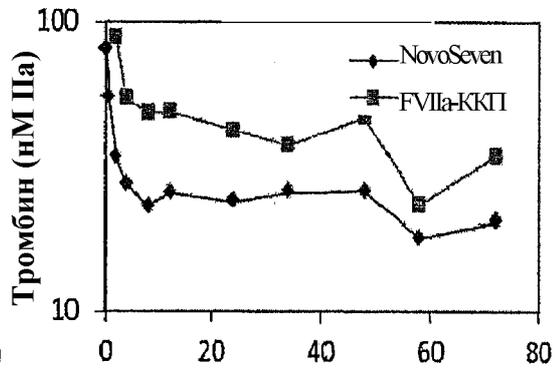
КПа = максимальное количество/пик



Время после инъекции (ч.)

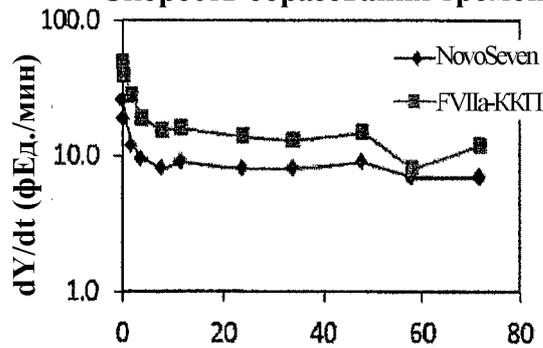
Фигура 29В

Максимальное количество тромбина в каждый момент времени



Время после инъекции (ч.)

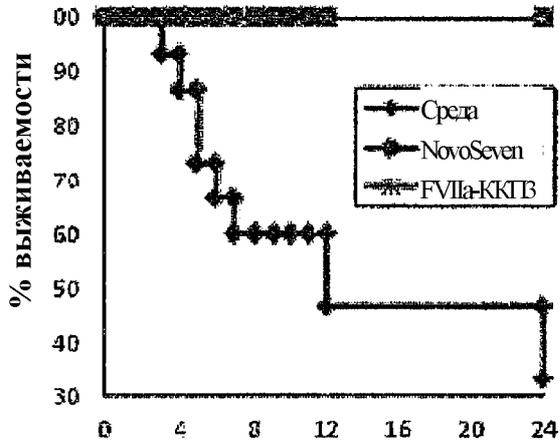
Скорость образования тромбина (dY/dt)



Время после инъекции (ч.)

Фигура 30А

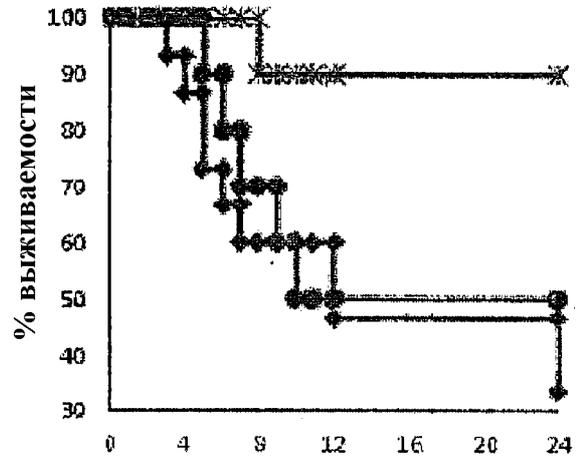
РХВ 15 мин. после введения



Время (часы)

Фигура 30В

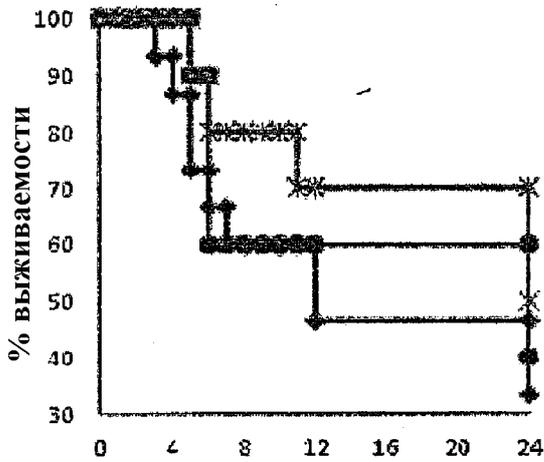
РХВ 24 часа после введения



Время (часы)

Фигура 30С

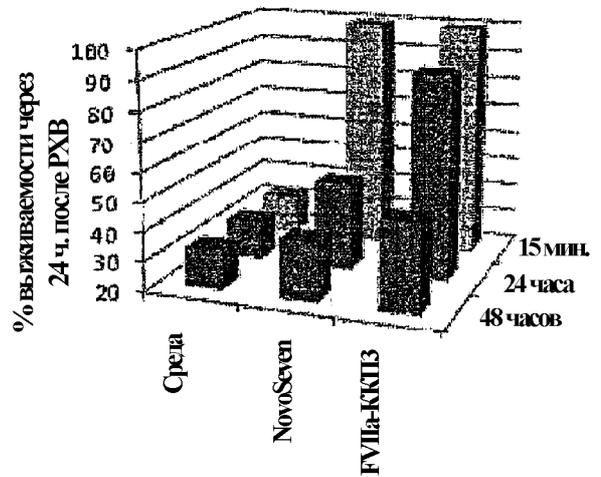
РХВ 48 часов после введения



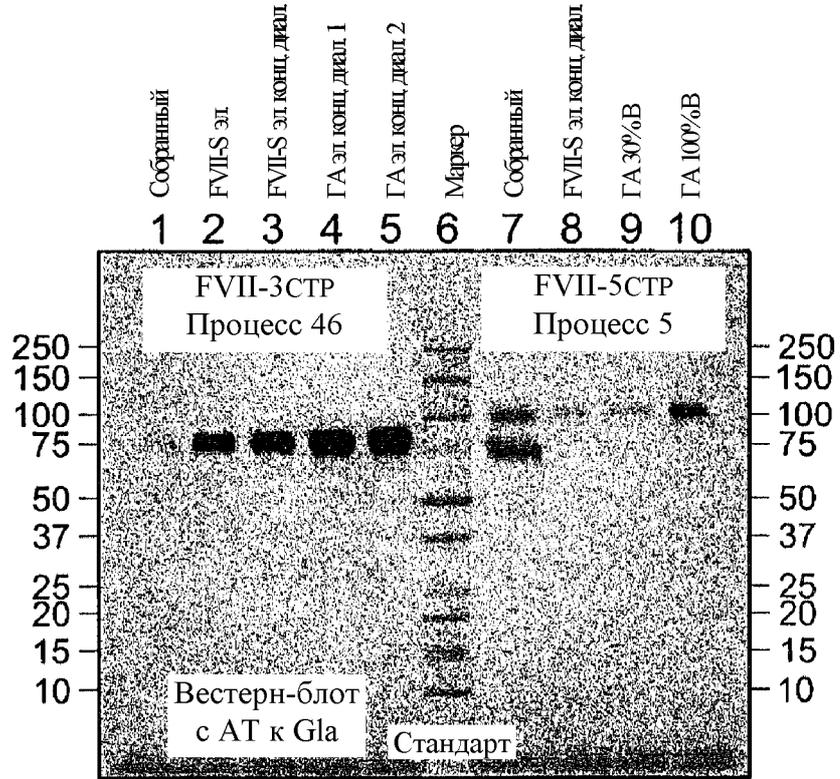
Время (часы)

Фигура 30D

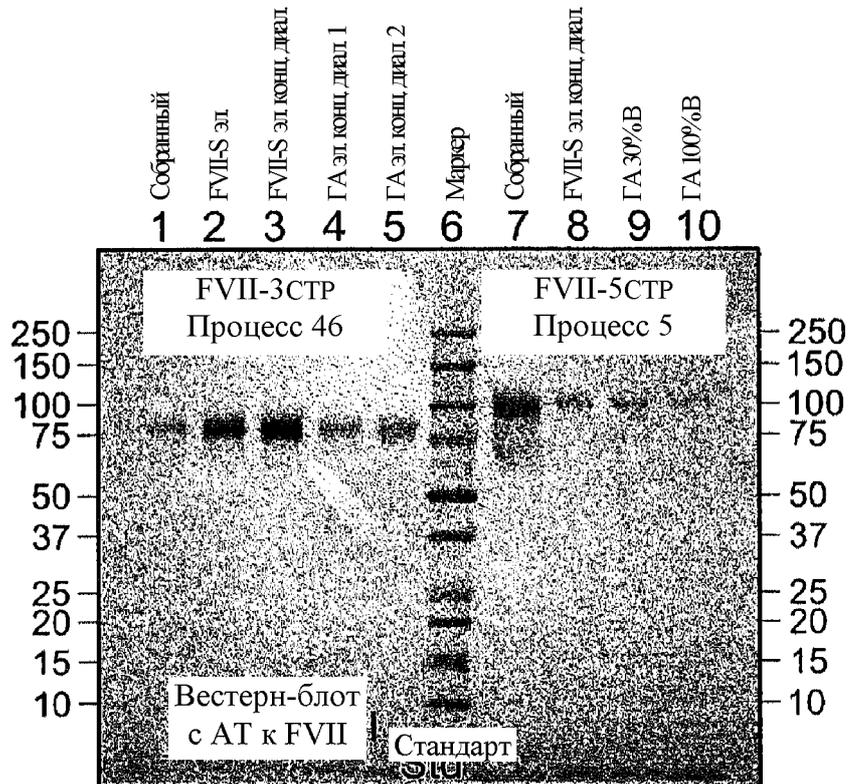
РХВ у гемофильных мышей



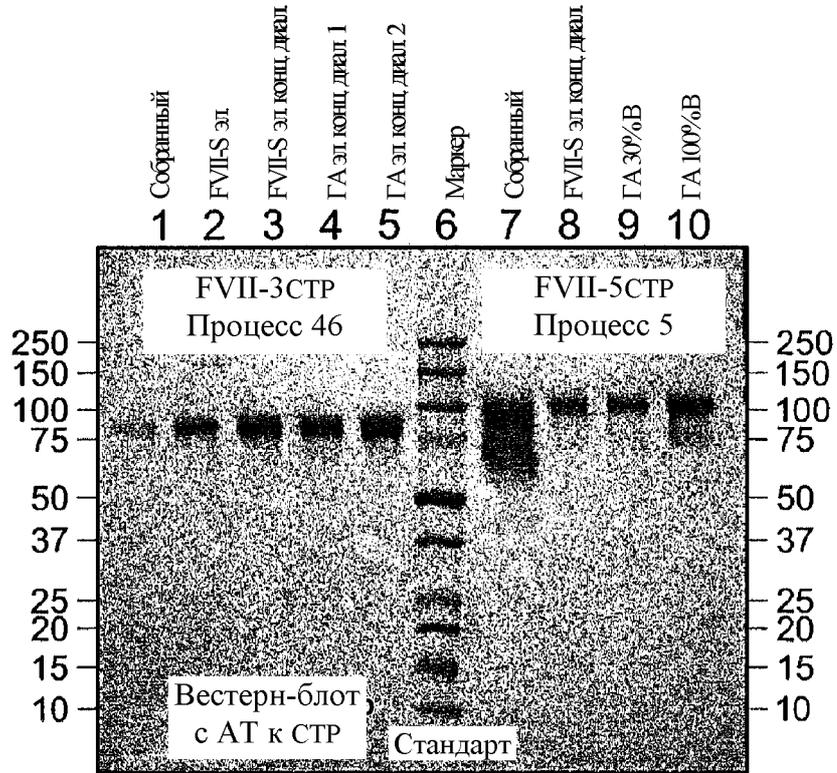
Фигура 31А



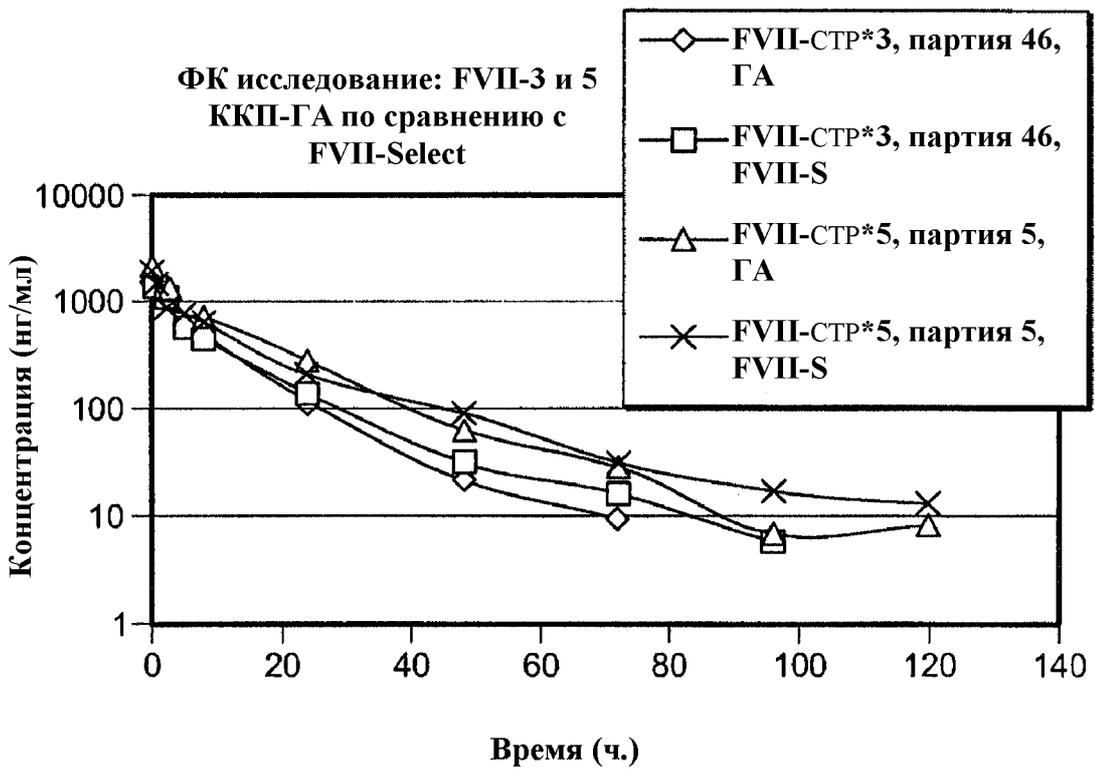
Фигура 31В



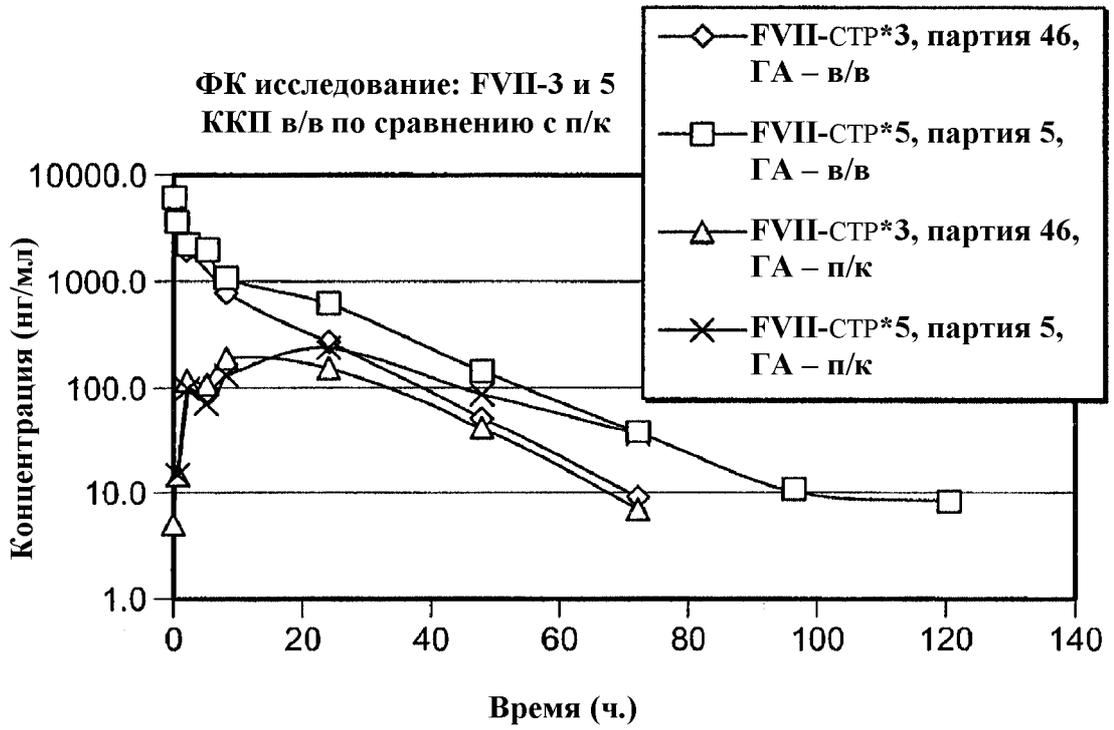
Фигура 31С



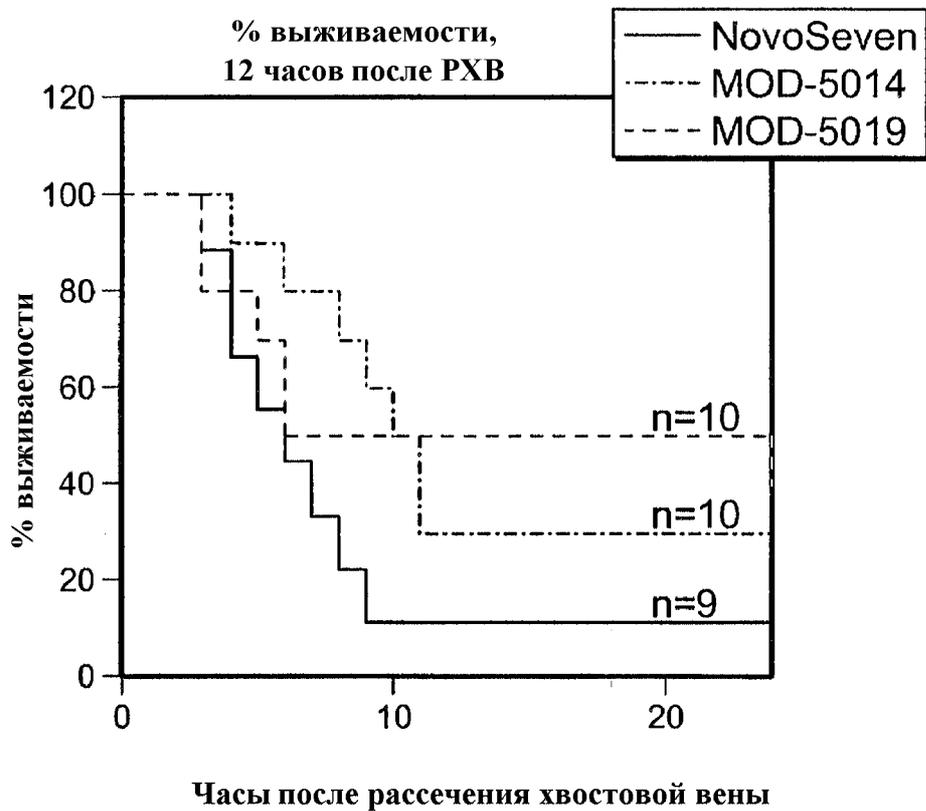
Фигура 32



Фигура 33

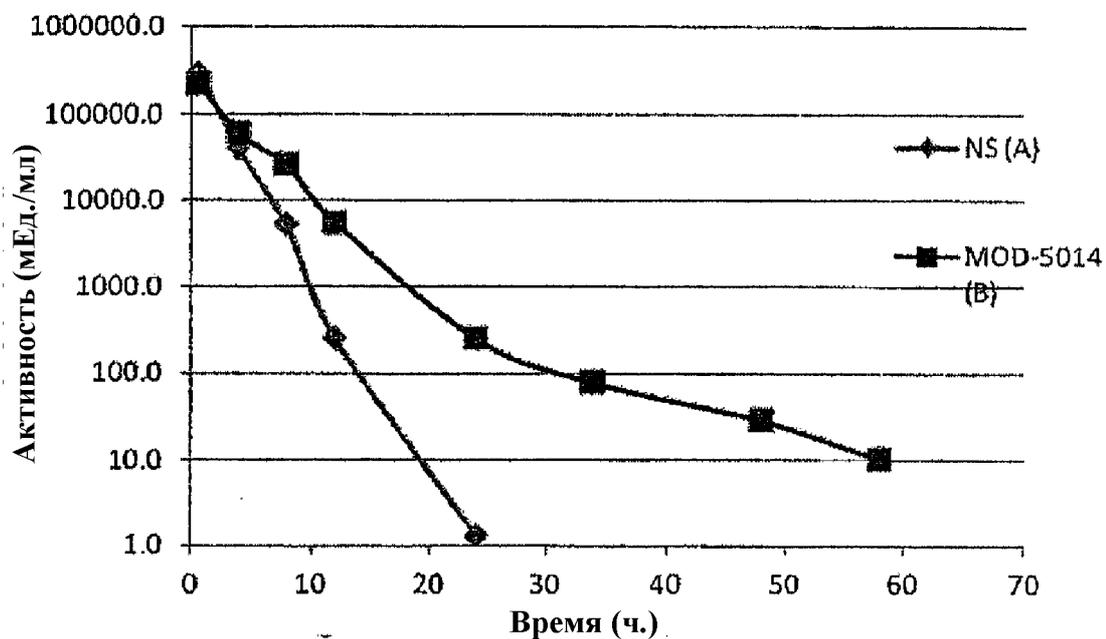


Фигура 34



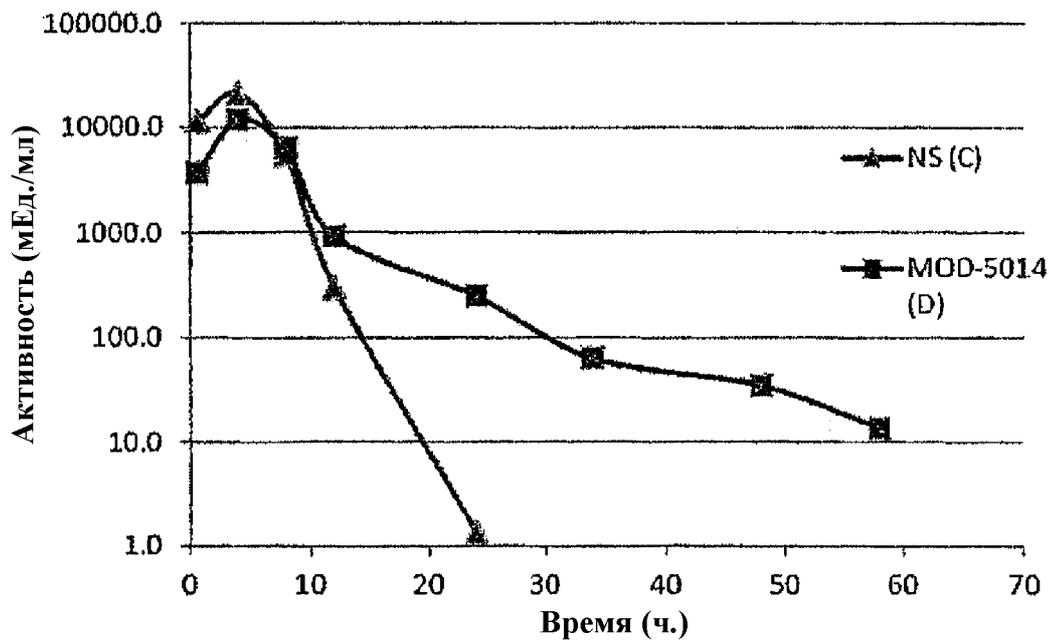
Фигура 35А

ФК – в/в крысам

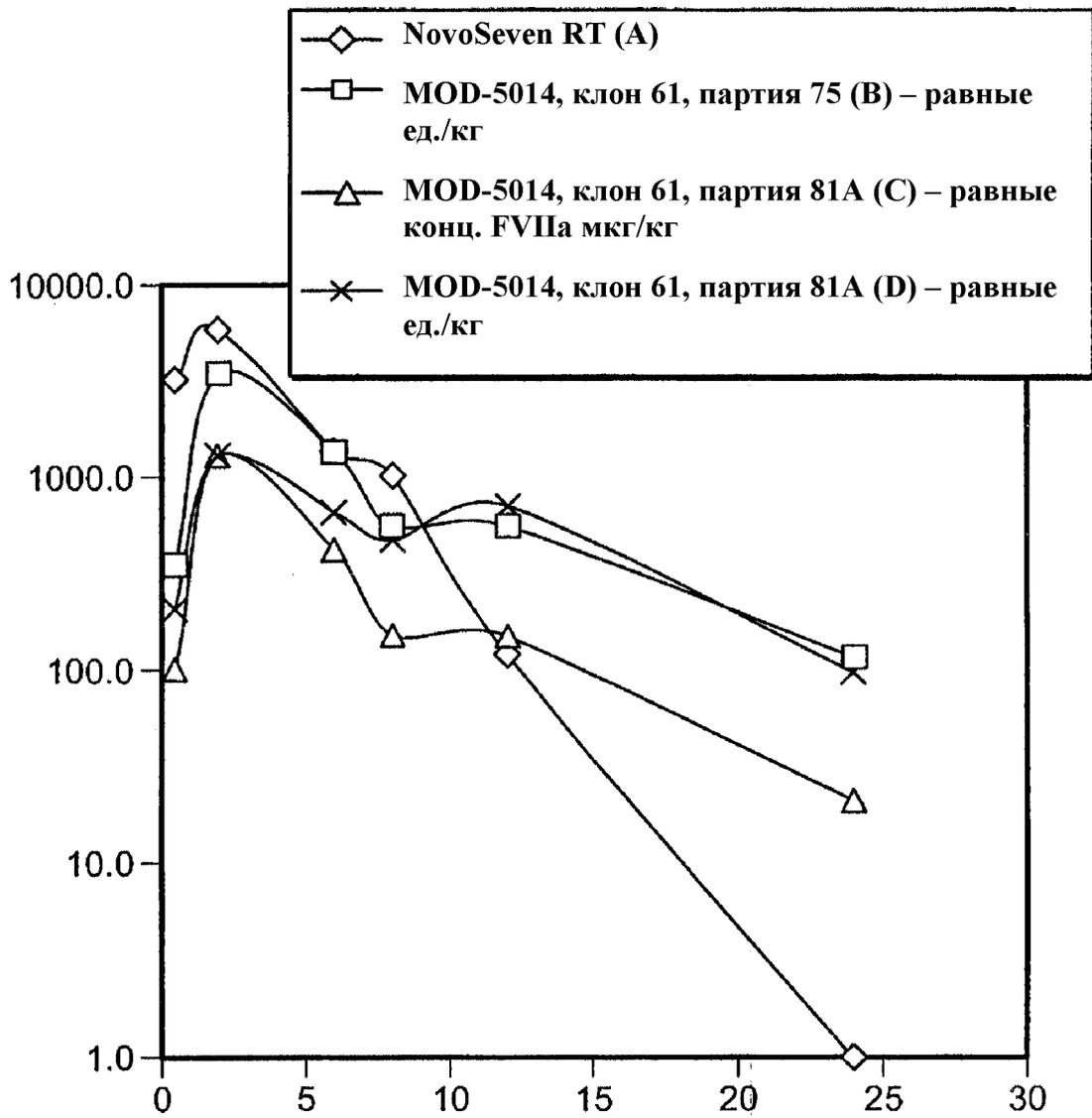


Фигура 35В

ФК – п/к крысам



Фигура 36



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202391385**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:  
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C07K 19/00, C07K 14/745, C07K 14/59, A61K 38/36, A61K 38/24, A61P 7/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 20090312254 A1 (MODIGENE, INC) 2009-12-17 [0039]-[0041], [0161]-[0170], [0190], [0325], формула	1-23
Y	PATRICIA QUADE-LYSSY et al. «Engineered Factor VII, Factor IX, and Factor X Variants for Hemophilia Gene Therapy». JOURNAL OF GENETIC SYNDROMES & GENE THERAPY. 2012, DOI: 10.4172/2157-7412.S1-013 весь документ	1-23
Y	WO 2011004361 A3 (PROLOR BIOTECH INC. и др.) 2011-01-13 [029]-[032], [038], [040], [044], [051], [056], [063]-[065], [075], [128], [0236]-[0237]	1-23

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

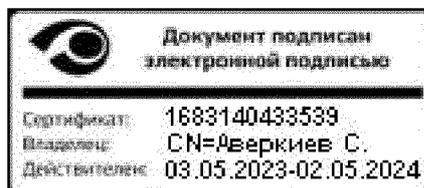
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 24 января 2024 (24.01.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202391385**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

*C07K 14/745* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*A61K 38/36* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01)  
*C07K 14/59* (2006.01)  
*A61K 38/24* (2006.01)

СПК:

**A61K 38/4846**  
**A61P 7/00**  
**A61P 7/04**  
**C07K 14/745**  
C07K 2319/31