

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392437** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.06.28

(51) Int. Cl. *A61K 38/36* (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.01

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИЧЕСКОЙ АРТРОПАТИИ С ПОМОЩЬЮ
ХИМЕРНЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

(31) **62/429,509; 62/529,896; 62/550,488;
62/558,793**

(72) Изобретатель:
**Дюмон Дженнифер, Джаин Ниша,
Глезебрук Десилу (US)**

(32) **2016.12.02; 2017.07.07; 2017.08.25;
2017.09.14**

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

(33) **US**

(62) **201991339; 2017.12.01**

(71) Заявитель:
**БАЙОВЕРЕТИВ ТЕРАПЬЮТИКС
ИНК. (US)**

(57) В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающие введение человеку эффективного количества химерного белка или композиции, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область.

202392437
A1

202392437

A1

**СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИЧЕСКОЙ АРТРОПАТИИ С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ
ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительным заявкам на патент США с регистрационными №№ 62/429509, поданной 2 декабря 2016 г., 62/529896, поданной 7 июля 2017 г., 62/550488, поданной 25 августа 2017 г., и 62/558793, поданной 14 сентября 2017 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к области средств терапии гемостатических нарушений.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Гемофилия представляет собой сцепленное с X-хромосомой нарушение свертываемости крови, вызываемое мутациями и/или делециями в генах, кодирующих коагуляционные белки, в частности, в гене фактора VIII (FVIII), что приводит к дефициту активности фактора VIII (гемофилия А), или гене фактора IX, что приводит к дефициту активности FIX (гемофилия В) (см., например, Peyvandi, F. *et al. Haemophilia* 12:82-89 (2006)). Заболевание характеризуется спонтанным кровоизлиянием и чрезмерным кровотечением после травмы. Лечение гемофилии заключается в заместительной терапии, направленной на восстановление активности FVIII и/или FIX для предотвращения спонтанного кровотечения (см., например, Mannucci, P.M., *et al., N. Engl. J. Med.* 344:1773-1779 (2001)).

[0004] С течением времени повторное кровотечение в мышцы и суставы, которое часто начинается в раннем детстве, приводит к гемофилической артропатии и повреждению суставов. Гемофилическая артропатия представляет собой широко распространенное и тяжелое осложнение, ассоциированное с гемофилией, которое часто приводит к боли, деформации и инвалидизации. Пациентами, которые наиболее часто страдают гемофилической артропатией, являются юноши в возрасте от 3 до 15 лет. Хотя суставами, поражаемыми с

наибольшей долей вероятности, являются коленные суставы, гемофилическая артропатия также может присутствовать в локтевых, голеностопных, плечевых суставах и позвоночнике. Гемофилическая артропатия, как известно, является необратимой. Поэтому доступное в настоящее время лечение гемофилической артропатии является ограниченным.

[0005] Соответственно, существует потребность в разработке новых способов лечения гемофилической артропатии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей химерный белок. В некоторых вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия включает синовит. В определенных вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия включает микрокровоотечение или субклиническое кровоотечение.

[0007] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения синовита у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления синовит ассоциирован с гемофилической артропатией.

[0008] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ снижения частоты возникновения ремоделирования сосудов в суставе человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено профилактическое лечение ремоделирования сосудов в суставе человека, имеющего гемофилию, включающее введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область.

[0009] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен

способ улучшения состояния мягких тканей, окружающих сустав, у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область.

[0010] В некоторых вариантах осуществления в результате введения у человека улучшается оценка функционального состояния суставов (HJHS). В некоторых вариантах осуществления в результате введения у человека уменьшается интенсивность суставной боли.

[0011] В определенных вариантах осуществления Fc-область специфично связывается с низкоаффинным рецептором для Fc-области иммуноглобулинов гамма II-b (FcγRIIB). В некоторых вариантах осуществления Fc-область специфично связывается со специфичным для дендритных клеток неинтегрином, захватывающим молекулу межклеточной адгезии 3 типа (DC-SIGN).

[0012] В некоторых аспектах способ дополнительно включает идентификацию человека, нуждающегося в лечении. В некоторых вариантах осуществления идентификация включает применение системы визуализации. В определенных вариантах осуществления система визуализации включает систему для рентгенографии, магнитно-резонансной томографии, ультразвукового исследования, энергетической ультразвуковой доплерографии или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления у человека экспрессируются один или несколько биомаркеров, ассоциированных с воспалением суставов.

[0013] В некоторых аспектах фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из фактора VII (FVII), фактора VIIa (FVIIa), фактора VIII (FVIII), фактора IX (FIX), фактора X (FX), фактора фон Виллебранда (VWF), их антигенсвязывающей части, которая специфично связывается с FIX и FX, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит FVIII-Fc. В других вариантах осуществления химерный белок содержит FIX-Fc. В одном варианте осуществления химерный белок содержит часть, представляющую собой фактор FVIII, и часть VWF, где часть FVIII включает в себя полипептид FVIII или его

фрагмент, где часть VWF включает в себя полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[0014] В некоторых вариантах осуществления химерный белок дополнительно содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни. В определенных вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает в себя альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию.

[0015] В некоторых аспектах осуществления эффективное количество композиции, например, химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня.

[0016] В других аспектах эффективное количество химерного белка, содержащего FIX-Fc, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FIX-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней, десять дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16

дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней или 28 дней.

[0017] В одном конкретном варианте осуществления химерный белок содержит часть FVIII, часть VWF, первую Fc-область и вторую Fc-область, где часть FVIII включает в себя полипептид FVIII или его фрагмент; где часть VWF включает в себя полипептид VWF или его фрагмент; где часть FVIII соединена с первой Fc-областью; где часть VWF соединена со второй Fc-областью; и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0018] E1. Способ лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область.

[0019] E2. Способ согласно E1, где обратимая гемофилическая артропатия включает синовит.

[0020] E3. Способ согласно E1 или E2, где обратимая гемофилическая артропатия включает микрокровотечение.

[0021] E4. Способ лечения синовита у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область.

[0022] E5. Способ согласно E4, где синовит ассоциирован с гемофилической артропатией.

[0023] E6. Способ предупреждения или снижения частоты возникновения ремоделирования сосудов в суставе человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область.

[0024] E7. Способ улучшения состояния мягких тканей, окружающих сустав, у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область.

[0025] E8. Способ согласно любому из E1-E7, где в результате введения у человека улучшается оценка функционального состояния суставов (HJHS).

[0026] E9. Способ согласно E8, где оценка функционального состояния суставов представляет собой сумму общих показателей суставов и комплексной оценки походки.

[0027] E10. Способ согласно E9, где общие показатели суставов измеряют на основании оценивания опухания, длительности опухания, атрофии мышц, хруста при движении, ограничения сгибания, ограничения разгибания, суставной боли и силы.

[0028] E11. Способ согласно E9, где комплексную оценку походки определяют на основании оценивания ходьбы, перемещения по лестнице, бега или подскоков на одной ноге.

[0029] E12. Способ согласно любому из E1-E11, где в результате введения у человека уменьшается интенсивность суставной боли.

[0030] E13. Способ согласно любому из E1-E12, где сустав выбран из группы, состоящей из одного или обоих локтевых суставов, одного или обоих коленных суставов, одного или обоих голеностопных суставов, одного или обоих плечевых суставов, одного или обоих тазобедренных суставов, одного или обоих лучезапястных суставов, одного или нескольких суставов кисти руки, одного или нескольких суставов стопы и любой их комбинации.

[0031] E14. Способ согласно любому из E1-E13, где сустав представляет собой локтевой сустав.

[0032] E15. Способ согласно любому из E1-E13, где сустав представляет собой коленный сустав.

[0033] E16. Способ согласно любому из E1-E13, где сустав представляет собой голеностопный сустав.

[0034] E17. Способ согласно любому из E1-E16, где Fc-область специфично связывается с низкоаффинным рецептором для Fc-области иммуноглобулинов гамма II-b (Fc γ RIIB).

[0035] E18. Способ согласно любому из E1-E17, где Fc-область специфично связывается со специфичным для дендритных клеток неинтегрином, захватывающим молекулу межклеточной адгезии 3 типа (DC-SIGN).

[0036] E19. Способ согласно любому из E1-E18, дополнительно включающий идентификацию человека, нуждающегося в лечении.

[0037] E20. Способ согласно E19, где идентификация включает применение системы визуализации.

[0038] E21. Способ согласно E20, где система визуализации включает систему для рентгенографии, магнитно-резонансной томографии, ультразвукового исследования, энергетической ультразвуковой доплерографии или любой их комбинации.

[0039] E22. Способ согласно E21, где у человека экспрессируются один или несколько биомаркеров, ассоциированных с воспалением суставов.

[0040] E23. Способ согласно любому из E1-E22, где фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из фактора VII (FVII), фактора VIIa (FVIIa), фактора VIII (FVIII), фактора IX (FIX), фактора X (FX), фактора фон Виллебранда (VWF), их антигенсвязывающей части, которая специфично связывается с FIX и FX, или любой их комбинации.

[0041] E24. Способ согласно любому из E1-E23, где химерный белок содержит FVIII-Fc.

[0042] E25. Способ согласно любому из E1-E23, где химерный белок содержит FIX-Fc.

[0043] E26. Способ согласно любому из E1-E24, где химерный белок содержит часть, представляющую собой фактор VIII, и часть VWF, где часть FVIII включает в себя полипептид FVIII или его фрагмент, где часть VWF включает в себя полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[0044] E27. Способ согласно любому из E23, E24 и E26, где полипептид FVIII включает в себя полноразмерный зрелый FVIII.

[0045] E28. Способ согласно любому из E23, E24 и E26, где полипептид FVIII включает в себя FVIII с делецией домена B.

[0046] E29. Способ согласно E28, где FVIII с делецией домена B содержит делецию всего домена B из FVIII или его части.

[0047] E30. Способ согласно E28 или E29, где FVIII с делецией домена B содержит делецию аминокислотных остатков 746-1648 зрелого FVIII.

[0048] E31. Способ согласно любому из E23, E24 и E25-E30,

где полипептид VWF включает в себя фрагмент VWF, содержащий домен D' и домен D3 из VWF.

[0049] E32. Способ согласно любому из E1–E31, где химерный белок дополнительно содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни.

[0050] E33. Способ согласно E32, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает в себя альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность HAP, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию.

[0051] E34. Способ согласно E32 или E33, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в фактор свертывания крови.

[0052] E35. Способ согласно E32 или E33, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен между фактором свертывания крови и Fc-областью.

[0053] E36. Способ согласно любому из E24 и E26–E35, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг.

[0054] E37. Способ согласно E36, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII–Fc, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 275 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 175 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 150 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 125 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 90 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 80 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 70 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 60 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 50 МЕ/кг, от

приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 40 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 30 МЕ/кг, от
 приблизительно 30 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 40 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 60 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 70 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 80 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 90 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от
 приблизительно 225 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от
 приблизительно 250 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от
 приблизительно 275 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг или от
 приблизительно 25 МЕ/кг до приблизительно 75 МЕ/кг.

[0055] E38. Способ согласно E36 или E37, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII-Fc, составляет от приблизительно 25 МЕ/кг до приблизительно 65 МЕ/кг.

[0056] E39. Способ согласно любому из E24 и E26-E38, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня.

[0057] E40. Способ согласно любому из E24 и E26-E38, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13

дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 3 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 4 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 5 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 6 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 8 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 9 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 11 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 12 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 13 до приблизительно 14 дней или от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней.

[0058] E41. Способ согласно любому из E24 и E26-E40, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 3 дней до приблизительно 5 дней.

[0059] E42. Способ согласно E25, где эффективное количество химерного белка, содержащего FIX-Fc, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг.

[0060] E43. Способ согласно E25 или E42, где эффективное количество химерного белка, содержащего FIX-Fc, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 30 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 40 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 60 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 70 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 80 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 90 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от

приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 90 МЕ/кг, от
приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 80 МЕ/кг, от
приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 70 МЕ/кг, от
приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 60 МЕ/кг, от
приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 50 МЕ/кг, от
приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 40 МЕ/кг или от
приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 30 МЕ/кг.

[0061] E44. Способ согласно любому из E25 и E42-E44, где эффективное количество химерного белка, содержащего FIX-Fc, составляет от приблизительно 50 МЕ/кг до 100 МЕ/кг.

[0062] E45. Способ согласно любому из E25 и E42-E44, где химерный белок, содержащий FIX-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней, десять дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней или 28 дней.

[0063] E46. Способ согласно любому из E25 и E42-E45, где химерный белок, содержащий FIX-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 1 до приблизительно 20 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 19 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 18 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 17 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 16 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 3 до приблизительно

21 дня, от приблизительно 4 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 6 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 7 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 8 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 9 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 10 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 11 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 12 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 13 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 14 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 15 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 16 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 17 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 18 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 19 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 20 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 15 до приблизительно 20 дней.

[0064] E47. Способ согласно любому из E25 и E42-E46, где химерный белок, содержащий FIX-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней или приблизительно 14 дней.

[0065] E48. Способ согласно любому из E1-E32, где химерный белок содержит часть FVIII, часть VWF, первую Fc-область и вторую Fc-область, где часть FVIII включает в себя полипептид FVIII или его фрагмент; где часть VWF включает в себя полипептид VWF или его фрагмент; где часть FVIII соединена с первой Fc-областью; где часть VWF соединена со второй Fc-областью; и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[0066] E49. Способ согласно любому из E1-E47, где Fc-область химерного белка облегчает локализацию химерного белка в суставе.

[0067] E50. Способ согласно любому из E1-E49, где человек имеет возраст менее 6 лет.

[0068] E51. Способ согласно любому из E1-E49, где человек имеет возраст от 6 лет до менее 12 лет.

[0069] E52. Способ согласно любому из E1-E49, где человек имеет возраст 12 лет или больше.

[0070] E53. Способ согласно любому из E1-E52, где фактор свертывания крови распределяется в тканях вне плазменного компартмента, а также в плазменном компартменте.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0071] На фиг. 1A-1F показаны полученные до исследования (фиг. 1A, 1C и 1E) и полученные в период исследования медианные (фиг. 1B, 1D и 1F) (IQR) показатели частоты кровотечений в годовом исчислении (ABR) для субъектов из исследования FVIII-Fc (фиг. 1A и 1B) и исследования FVIII-Fc у детей (фиг. 1C-1F), имеющих суставы-мишени на исходном уровне. На фиг. 1C-1D показаны сводные данные из исследования FVIII-Fc у детей, тогда как на фиг. 1E-1F показаны те же данные, стратифицированные по возрасту субъектов (возраст менее 6 лет и возраст от 6 до менее 12 лет).

[0072] На фиг. 2A-2B показано среднее изменение общей модифицированной оценки функционального состояния суставов при гемофилии (mHJHS; ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 расширенного исследования (фиг. 2A; ось x) и на протяжении года 3 расширенного исследования (фиг. 2B; ось x). На фиг. 2B проводятся различия между наличием (есть; треугольники) и отсутствием (нет; кружки) суставов-мишеней на исходном уровне.

[0073] На фиг. 3A-3C показано среднее изменение общей mHJHS (ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 расширенного исследования (фиг. 3A; ось x) и года 3 расширенного исследования (фиг. 3B) и в исследовании FVIII-Fc у детей на протяжении года 2 расширенного исследования (фиг. 3C; ось x) для субъектов, получавших профилактическое лечение до исследования, и субъектов, получавших эпизодическое (по необходимости) лечение до исследования.

[0074] На фиг. 4 показано среднее изменение общей mHJHS (ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 (ось x) для субъектов, имеющих суставы-мишени на исходном уровне в исследовании FVIII-Fc (квадраты), и

субъектов, не имеющих суставы-мишени на исходном уровне в исследовании FVIII-Fc (ромбы).

[0075] На фиг. 5 показано среднее изменение общей mHHS (ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 (ось x) для субъектов в самом нижнем quartile ухудшения (Q1; $\geq 1-10$) оценок mHHS относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc (ромбы), втором снизу quartile ухудшения (Q2; $\geq 10-22$) оценок mHHS относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc (квадраты); втором сверху quartile ухудшения (Q3; $\geq 22-34$) оценок mHHS относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc (треугольники) и самом верхнем quartile ухудшения (Q4; $\geq 34-37$) оценок mHHS относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc (ромбы).

[0076] На фиг. 6 показано среднее изменение общей mHHS (ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 (ось x) для субъектов, имеющих суставы-мишени на исходном уровне в исследовании FVIII-Fc.

[0077] На фиг. 7 показано среднее изменение общей mHHS (ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 (ось x) для опорных суставов (ромбы) и неопорных суставов-мишеней (квадраты).

[0078] На фиг. 8 показано среднее изменение mHHS (ось y) относительно исходного уровня в исследовании FVIII-Fc на протяжении года 2 (ось x) для опухания (ромбы), объема движений (квадраты) и силы (треугольники).

[0079] На фиг. 9 показано среднее (SEM) изменение mHHS (ось y) у пациентов в исследовании FVIII-Fc для нестабильности сустава (темно-серые квадраты), опухания (черные треугольники), атрофии мышц (светло-серые квадраты), суставной боли (светло-серые ромбы), хруста (черные квадраты) и силы (светло-серые кружки). Показаны общие оценки на исходном уровне (BL) для каждого измеряемого показателя mHHS.

[0080] На фиг. 10A-10B показаны полученные до исследования (фиг. 10A) и полученные в период исследования медианные (фиг. 10B) (IQR) показатели частоты кровотечений в годовом исчислении (ABR) для субъектов из исследования rFIXFc. На фиг. 10B

дополнительно показаны совокупная ABR в период исследования (темные кружки), совокупная ABR для суставов-мишеней (серые ромбы) и ABR для спонтанных кровотечений в суставах-мишенях (серые треугольники). WP=еженедельная профилактика; IP=профилактика с индивидуализированными интервалами и MP=модифицированная профилактика (фиг. 10А-10В).

[0081] Фиг. 11 представляет собой графическое представление, из которого видно количество подлежащих оценке суставов-мишеней (голеностопных суставов, коленных суставов, локтевых суставов, тазобедренных суставов, лучезапястных суставов и плечевых суставов), восстановившихся и не восстановившихся в течение по меньшей мере двенадцати последовательных месяцев периода последующего наблюдения у тех субъектов (n=37), которые не подвергались хирургическим операциям на суставах в течение двенадцати месяцев после начала периода последующего наблюдения. Количество (n) суставов-мишеней каждого типа наложено на соответствующие данные, при этом в общей сложности оценивали 93 сустава-мишени. Процентные доли восстановившихся (100%) и не восстановившихся (0%) суставов-мишеней показаны ниже оси x.

[0082] Фиг. 12А-12С представляют собой полученные с помощью однофотонной эмиссионной томографии (SPECT) изображения мышей, которым вводили FIX, меченный $^{125}\text{I-SIB}$ (фиг. 12А), FIXFc, меченный $^{125}\text{I-SIB}$ (фиг. 12В), или гликопегилированный FIX, меченный $^{125}\text{I-SIB}$ (фиг. 12С). На фиг. 12D-12G показаны непосредственные сравнения мышей, которым вводили FIX, меченный $^{125}\text{I-SIB}$, FIXFc, меченный $^{125}\text{I-SIB}$, или гликопегилированный FIX, меченный $^{125}\text{I-SIB}$, в различные моменты времени. С помощью тепловых карт указана относительная концентрация (% ID/г) метки $^{125}\text{I-SIB}$ у каждой мыши (фиг. 12А-12G).

[0083] Фиг. 13А-13В представляют собой графики, иллюстрирующие интенсивность локализации метки $^{125}\text{I-SIB}$ у мышей, показанных на фиг. 12А-12G, после введения FIX, меченного $^{125}\text{I-SIB}$, FIXFc, меченного $^{125}\text{I-SIB}$, или гликопегилированного FIX, меченного $^{125}\text{I-SIB}$, с течением времени в коленных суставах (фиг. 13А) и плечевых суставах (фиг. 13В). Данные собирали как для

правого, так и для левого коленных суставов, а также для правого и левого плечевых суставов, и их объединяли с получением показанных данных (фиг. 13А и 13В соответственно).

[0084] Фиг. 14А представляет собой график, иллюстрирующий относительную активность меченого FIX и меченого FIXFc по сравнению с немечеными FIX и FIXFc согласно измерению с помощью хромогенного анализа или одностадийного анализа. Фиг. 14В представляет собой график, иллюстрирующий фармакокинетические свойства меченых и немеченых молекул FIX у мышей НемВ.

[0085] Фиг. 15А–15F представляют собой рисунки, иллюстрирующие объем движений в локтевом (сгибание: фиг. 15А и разгибание: фиг. 15В), коленном (сгибание: фиг. 15С и разгибание: фиг. 15D) и голеностопном (подошвенное сгибание: фиг. 15Е и тыльное сгибание: фиг. 15F) суставах, с наложенными модифицированными оценками функционального состояния суставов при гемофилии (HJHS) и степенями сгибания/разгибания.

[0086] Фиг. 16 представляет собой блок-схему, в общих чертах описывающую способы, используемые для исследования эффектов rFVIII-Fc в отношении связывания FcγR, его интернализации, опосредованной им передачи сигнала и выработки цитокинов и изменений экспрессии генов, а также последующих взаимодействий с Т-клетками и эффектов в их отношении *in vitro*.

[0087] Фиг. 17А–17С представляют собой графические представления относительных уровней экспрессии Fcγ-рецепторов CD16 (фиг. 17А), CD32 (фиг. 17В) и CD64 (фиг. 17С) на поверхности макрофагов и дендритных клеток после обработки иммунными комплексами с пероксидазой хрена (HRP-IC; положительный контроль), IgG1, рекомбинантным FVIII (rFVIII) или слитым белком rFVIII-Fc (rFVIII-Fc). Звездочки (*) указывают на степень значимости (n=3; * = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,005$, значимость для HRP-IC по сравнению с другими видами обработки не показана).

[0088] Фиг. 18А–18С представляют собой графические представления, иллюстрирующие относительную передачу сигнала после обработки с помощью rFVIII или rFVIII-Fc. На фиг. 18А показана передача сигнала, измеренная по фосфорилированию Syk, в

клеточной линии моноцитов THP-1 ("THP-1"), моноцитах, моноцитарных макрофагах из периферической крови ("макрофагах") и моноцитарных дендритных клетках из периферической крови, обработанных с помощью HRP-IC, IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc в течение 15 минут. На фиг. 18B показано относительное фосфорилирование Syk в макрофагах, обработанных с помощью rFVIIIIFc ("WT"), мутантного rFVIIIIFc, который не способен связываться с неонатальным Fc-рецептором ("FcRn-мутант"), или мутантного rFVIIIIFc, который не способен связываться с FcγR ("FcγR-мутант"). На фиг. 18C показана относительная выработка провоспалительных цитокинов интерлейкина 1b (IL-1b), IL-6, IL-8, IL-10 и фактора некроза опухоли альфа (TNFα), в макрофагах через двадцать четыре часа после обработки с помощью HRP-IC, IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc.

[0089] На фиг. 19 показан статус относительного фосфорилирования фосфатазы-1, содержащей домен области гомологии Src 2 (SHP1), pSHP2, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-5-фосфатазы 1 (SHIP1) и pSHIP2 через одну минуту, пять минут и тридцать минут после обработки с помощью rFVIII или rFVIIIIFc. Звездочки (*) указывают на степень значимости ($n=3$; $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,005$).

[0090] Фиг. 20A-20M представляют собой графические представления паттернов экспрессии генов в толерогенных макрофагах после обработки с помощью rFVIII или rFVIIIIFc. Фиг. 20A-20B представляют собой диаграммы Венна, иллюстрирующие распределение генов, экспрессия которых была значительно снижена (фиг. 20A), и распределение генов, экспрессия которых была значительно повышена (фиг. 20B), в моноцитарных макрофагах, обработанных с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc в течение шести часов ($n=3$). Фиг. 20C-20G представляют собой графики, демонстрирующие относительные уровни экспрессии различных генов сигнальных путей NRF2 и путей метаболизма липидов, таких как ген гемоксигеназы 1 (Hmox1; фиг. 20C), активируемого пролифератором пероксисом рецептора гамма (PPARγ; фиг. 20D), липопротеинлипазы (LPL; фиг. 20E), белка раннего ростового ответа 2 (EGR2; фиг. 20F) и представителя 4A1 семейства транспортеров органических

анионов, являющегося переносчиком растворенных веществ (SLC04A1; фиг. 20G); CD206 через 6 часов (фиг. 20I) и 12 часов (фиг. 20J) после обработки и аргиназы 1 (ARG1; фиг. 20L), измеренные с помощью количественной ПЦР после обработки с помощью rFVIII или rFVIIIIFc. Звездочки (*) указывают на степень значимости ($n=8$; $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,005$; фиг. 20C–20G). Фиг. 20K и 20M представляют собой графики, демонстрирующие количество клеток, экспрессирующих CD206, определенное с помощью проточной цитометрии. Кроме того, было обнаружено, что rFVIIIIFc-обученные макрофаги проявляют характерный M2-подобный фенотип (фиг. 20I–20M). В частности, макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией CD206 (также известного как маннозный рецептор С-типа 1; MRC1), чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 6 часов (фиг. 20I) и через 24 часа (фиг. 20J), и макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией ARG1, чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 24 часа (фиг. 20M).

[0091] Фиг. 21A представляет собой блок-схему, схематически иллюстрирующую способы, используемые для определения эффектов обработки с помощью rFVIIIIFc в отношении дифференцировки Т-клеток. Фиг. 21B представляет собой графическое представление процентной доли регуляторных Т-клеток через шесть дней после обработки макрофагов или дендритных клеток с помощью IgG1 (контроль), rFVIII или rFVIIIIFc в течение 24 часов с последующим совместным культивированием с необученными CD4-положительными Т-клетками. Фиг. 21C представляет собой графическое представление процентной доли регуляторных Т-клеток после культивирования необученных CD4-положительных Т-клеток в средах, кондиционированных макрофагами или дендритными клетками, предварительно обработанными с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc.

[0092] Фиг. 22 представляет собой иллюстрацию предполагаемого механизма индуцируемой rFVIIIIFc дифференцировки регуляторных Т-клеток.

[0093] Фиг. 23 представляет собой иллюстрацию

предполагаемых эффектов rFIXFc в отношении макрофагов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0094] В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающие введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область. Химерный белок, раскрытый в данном документе, также можно применять для лечения синовита, микрокровоотечения, воспаления одного или нескольких суставов, ремоделирования сосудов или любой их комбинации в суставе человека, имеющего гемофилию. В определенных вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают улучшение состояния мягких тканей, окружающих сустав, у человека, имеющего гемофилию.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0095] Следует отметить, что форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким таким объектам; например, под "нуклеотидной последовательностью" понимают одну или несколько нуклеотидных последовательностей. В связи с этим формы единственного числа, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0096] Кроме того, "и/или" при использовании в данном документе следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0097] Следует понимать, что во всех случаях, когда аспекты описываются в данном документе с формулировкой "содержащий", также предусмотрены другие аналогичные аспекты, описываемые

терминами "состоящий из" и/или "состоящий по сути из".

[0098] Если не определено иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

[0099] Единицы измерения, приставки и символы обозначены в их форме, принятой согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- к карбокси-концу. Приведенные в данном документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут обеспечиваться посредством ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определяются посредством ссылки на настоящее описание во всей его полноте.

[00100] Термин "приблизительно" используется в данном документе в значении примерно, порядка, около или ориентировочно. Если термин "приблизительно" используется в сочетании с числовым диапазоном, то он модифицирует данный диапазон, расширяя границы выше и ниже изложенных числовых значений. Таким образом, "приблизительно 10-20" означает "от приблизительно 10 до приблизительно 20". В целом, термин "приблизительно" может модифицировать числовое значение выше и ниже заявленного значения с отклонением, например на 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[00101] "Введение", как используется в данном документе, означает предоставление фармацевтически приемлемой композиции, например, химерного белка, раскрытого в данном документе, субъекту фармацевтически приемлемым путем. Пути введения могут

быть внутривенными, например, в случае с внутривенной инъекцией и внутривенной инфузией. Дополнительные пути введения включают, например, подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и легочное введение. Химерный белок и гибридные белки можно вводить в составе фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления композицию, например, химерный белок, вводят человеку посредством генной терапии, например, где один или несколько полинуклеотидов, кодирующих фактор свертывания крови и/или Fc-область, вводят человеку, и фактор свертывания крови и/или Fc-область экспрессируются у человека.

[00102] "Лечить", "лечение" или "осуществление лечения", как используется в данном документе, относятся, например, к уменьшению тяжести заболевания или состояния; уменьшению продолжительности течения заболевания; облегчению или устранению одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием; обеспечению благоприятных эффектов у субъекта с заболеванием или состоянием, при этом не обязательно с излечением заболевания или состояния, но не включают профилактику или предупреждение гемофилической артропатии или ее симптомов. В одном варианте осуществления термин "осуществление лечения" или "лечение" означает улучшение оценки функционального состояния суставов при гемофилии (HJHS) или модифицированной HJHS (mHJHS) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления улучшается совокупная HJHS или mHJHS. В некоторых вариантах осуществления улучшается индивидуальная оценка для одного или нескольких суставов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления термин "осуществление лечения" или "лечение" означает улучшение оценки качества жизни (QoL) у субъекта. В определенных вариантах осуществления с помощью оценки QoL анализируется отношение субъекта к занятиям спортом и досугу, физическому здоровью, решению вопросов, связанных с гемофилией, планированию семьи, ощущениям (в отношении гемофилии), планам на будущее, партнерским отношениям и половой сфере, лечению, взглядам (на себя), работе и учебе в школе или любой их комбинации. В других вариантах осуществления термин "осуществление лечения" или

"лечение" означает уменьшение эффектов и/или степени тяжести одного или нескольких микрокровоотечений. В другом варианте осуществления термин "осуществление лечения" или "лечение" означает уменьшение интенсивности опухания, и/или воспаления, и/или боли в одном или нескольких суставах-мишенях. В другом варианте осуществления термин "осуществление лечения" или "лечение" означает уменьшение степени ремоделирования сосудов в одном или нескольких суставах-мишенях.

[00103] "Предупреждение" или "осуществление предупреждения", как используется в данном документе, относится к уменьшению или снижению частоты возникновения или степени тяжести конкретного исхода. В некоторых вариантах осуществления предупреждение исхода достигается посредством профилактического лечения.

[00104] Используемый в данном документе термин "сопоставимый" означает, что сравниваемая скорость или уровень, полученные в результате применения, например, химерного полипептида, равны, практически равны эталонной скорости или уровню или сходны с ними. Используемый в данном документе термин "сходный" означает, что сравниваемая скорость или уровень отличаются на не более чем 10% или не более чем 15% от эталонной скорости или уровня (например, скорость образования FХа химерным полипептидом, состоящим по сути из двух Fc-частей и процессированного FVIII или состоящим из них, где указанный процессированный FVIII слит с одной Fc из двух Fc-частей). Термин "практический равный" означает, что сравниваемая скорость или уровень отличаются на не более чем на 0,01%, 0,5% или 1% от эталонной скорости или уровня.

[00105] Гемостатическое нарушение, как используется в данном документе, означает генетически наследуемое или приобретенное состояние, характеризующееся склонностью к кровоизлиянию, спонтанно либо в результате травмы, из-за нарушенной способности или неспособности образовывать фибриновый сгусток. Примеры таких нарушений включают формы гемофилии. Тремя основными формами являются гемофилия А (дефицит фактора VIII), гемофилия В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и

гемофилия С (дефицит фактора XI, легкая склонность к кровотечению). Другие гемостатические нарушения включают, например, болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора XI (дефицит PTA), дефицит фактора XII, дефициты или аномалии структуры фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, который представляет собой дефект или дефицит GPIb. GPIb, рецептор VWF, может быть дефектным и приводить к невозможности образования первичного сгустка (первичного гемостаза) и повышенной склонности к кровотечению, а также к тромбастении Гланцманна-Негели (тромбастении Гланцманна). При печеночной недостаточности (острой и хронической формах) имеет место недостаточная выработка печенью факторов коагуляции; это может увеличивать риск кровотечения.

[00106] "Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC)", как используется в данном документе, соответствует термину, общепринятому в области фармакологии, и определяется на основании скорости и степени абсорбции FVIII после введения. AUC определяют за определенный период времени, такой как 12, 18, 24, 36, 48 или 72 часа, или экстраполируют до бесконечности на основании наклона кривой. Если в данном документе не указано иное, AUC определяют для бесконечности. Определение AUC можно проводить у одного субъекта или в популяции субъектов, для которой рассчитывают среднее значение.

[00107] Под термином "прокоагулянтная активность" подразумевается способность фактора коагуляции, например, белка FVIII или FIX, согласно настоящему изобретению принимать участие в каскаде свертывания крови, заменяя нативный фактор коагуляции, например, нативный FVIII или FIX. Например, рекомбинантный белок FIX согласно настоящему изобретению обладает прокоагулянтной активностью, если он может превратить фактор X (FX) в активированный фактор X (FXa) в присутствии фактора VIII (FVIII), что тестируется, например, в хромогенном анализе. В другом варианте осуществления активность FIX представляет собой способность образовывать теназный комплекс. В других вариантах

осуществления активность FIX представляет собой способность образовывать тромбин (или сгусток).

[00108] Все из ссылок на нумерацию аминокислотную иммуноглобулинов или фрагментов или областей иммуноглобулинов основаны на Kabat *et al.* 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (Рецептор FcRn был выделен у некоторых видов млекопитающих, в том числе у людей. Последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши являются известными (Story *et al.*, *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Fc может содержать CH2- и CH3-домены иммуноглобулина с шарнирной областью иммуноглобулина или без нее. Иллюстративные варианты Fc представлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00109] "Гибридные" полипептиды и белки, как используется в данном документе, означают комбинацию химерного полипептида со вторым полипептидом. Химерный полипептид и второй полипептид в гибридной молекуле могут быть связаны друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как взаимодействия между зарядами или гидрофобные взаимодействия. Химерный полипептид и второй полипептид в гибридной молекуле могут быть связаны друг с другом посредством дисульфидных или других ковалентных связей. Гибридные молекулы описаны в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См. также патенты США № 7404956 и 7348004, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Второй полипептид может представлять собой вторую копию того же самого химерного полипептида или может представлять собой неидентичный химерный полипептид.

[00110] Как используется в данном документе, "аминокислоту, соответствующую", "сайт, соответствующий" или "эквивалентную аминокислоту" в последовательности белка идентифицируют путем выравнивания для максимального увеличения идентичности или

сходства между первой последовательностью белка, например, последовательностью FVIII или FIX, и второй последовательностью белка, например, второй последовательностью FVIII или второй последовательностью FIX. Номер, используемый для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности белка, соответствует номеру, используемому для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности белка.

[00111] Используемый в данном документе термин "сайт вставки" относится к номеру аминокислотного остатка в полипептиде (как правило, зрелом полипептиде; например, зрелом полипептиде FVIII или зрелом полипептиде FIX) или его фрагменте, варианте или производном, который находится непосредственно выше положения, в которое может быть вставлен гетерологичный компонент. "Сайт вставки" указывается под номером, при этом номер представляет собой номер аминокислоты в указанной последовательности белка, которой соответствует сайт вставки, находящейся непосредственно с N-концевой стороны от положения вставки. Например, фраза "домен EGF2 содержит гетерологичный компонент в сайте вставки, который соответствует аминокислоте 105" в данной последовательности указывает на то, что гетерологичный компонент расположен между двумя аминокислотами, соответствующими аминокислоте 105 и аминокислоте 106 в этой последовательности. Однако специалист в данной области сможет легко идентифицировать соответствующее положение в любом варианте указанного белка, и настоящее изобретение не ограничено вставками, произведенными исключительно в вариантах, конкретно раскрытых в данном документе. Скорее, раскрытые в данном документе вставки могут быть произведены в любых родственных вариантах или их фрагментах, обладающих активностью, в положении, соответствующем положению в раскрытых в данном документе вариантах.

[00112] Используемая в данном документе фраза "непосредственно ниже аминокислоты" относится к положению прямо после концевой карбоксильной группы аминокислоты. Аналогично, фраза "непосредственно выше аминокислоты" относится к положению прямо после концевой аминогруппы аминокислоты. Следовательно,

используемая в данном документе фраза "между двумя аминокислотами в сайте вставки" относится к положению, в котором гетерологичный компонент (например, компонент, обеспечивающий продление периода полужизни) вставлен между двумя соседними аминокислотами.

[00113] Термины "вставленный", "вставлен", "вставлен в" или грамматически родственные термины, используемые в данном документе, относятся к положению гетерологичного компонента (например, компонента, обеспечивающего продление периода полужизни) в слитом полипептиде относительно аналогичного положения в указанном белке (например, белке FVIII или FIX). Специалистам в данной области будет понятно, как идентифицировать соответствующие положения для вставки относительно других полипептидных последовательностей, например, других вариантов FVIII и FIX. Используемые в данном документе термины относятся к характеристикам рекомбинантного полипептида, раскрытого в данном документе, и не указывают, не подразумевают или не предполагают каких-либо способов или процесса, с помощью которых был получен слитый полипептид. Например, по отношению к слитому полипептиду, предусмотренному в данном документе, фраза "гетерологичный компонент вставлен в домен EGF2 непосредственно ниже остатка 105 полипептида FIX" означает, что слитый полипептид содержит гетерологичный компонент непосредственно ниже аминокислоты, соответствующей аминокислоте 105 в конкретном варианте FIX, например, ограничен аминокислотами, соответствующими аминокислотам 105 и 106 варианта FIX.

[00114] "Слитый" или "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, соединенную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она естественным образом не соединена в природе. Аминокислотные последовательности, которые в обычных условиях существуют в отдельных белках, могут быть объединены в слитом полипептиде, или аминокислотные последовательности, которые в обычных условиях существуют в одном и том же белке, могут быть размещены в новом порядке в слитом полипептиде, например, при слиянии домена FVIII или домена FIX согласно настоящему изобретению с

Fc-доменом Ig. Слитый белок создают, например, путем химического синтеза или путем создания полинуклеотида, в котором области пептида кодируются в необходимом взаиморасположении, и обеспечения его трансляции. Слитый белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью с помощью ковалентной непептидной связи или нековалентной связи.

[00115] Термины "гетерологичный" и "гетерологичный компонент" означают, что полинуклеотид, полипептид или другой компонент получены из объекта, отличающегося от того объекта, с которым его сравнивают. Например, гетерологичный полипептид может быть синтетическим или полученным от другого вида, из другого типа клеток индивидуума или из того же или другого типа клеток различных индивидуумов. В одном аспекте гетерологичный компонент представляет собой полипептид, слитый с другим полипептидом с получением слитого полипептида или белка. В другом аспекте гетерологичный компонент представляет собой молекулу, не являющуюся полипептидом, как, например, PEG, конъюгированный с полипептидом или белком.

[00116] Термины "соединенный" и "слитый", используемые в данном документе, относятся к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной соответственно ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно присоединена ко второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности или объединена с ней, или, в качестве альтернативы, промежуточная последовательность может ковалентно соединять первую последовательность со второй последовательностью. Термин "соединенный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на C-конце или N-конце, но также включает вставку всей первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) между любыми двумя аминокислотами во второй аминокислотной последовательности (или соответственно в первой

аминокислотной последовательности). В одном варианте осуществления первая аминокислотная последовательность соединена со второй аминокислотной последовательностью с помощью пептидной связи или линкера. Первая нуклеотидная последовательность может быть соединена со второй нуклеотидной последовательностью с помощью фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (в случае полипептидных цепей), или нуклеотид или цепь нуклеотидов (в случае цепей нуклеотидов), или любой химический компонент (как в случае полипептидных, так и полинуклеотидных цепей). Термин "соединенный" также обозначается дефисом (-).

[00117] Используемый в данном документе термин "связанный с" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой цепью аминокислот и второй цепью аминокислот. В одном варианте осуществления термин "связанный с" означает ковалентную непептидную связь или нековалентную связь. Эта связь может быть обозначена двоеточием, т. е. (:). В другом варианте осуществления он означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи. Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или дисульфидный мостик с тиольной группой во втором цистеиновом остатке. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CN1 и CL связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU). Примеры ковалентных связей включают без ограничения пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агостическую связь, банановую связь, дипольную связь, обратную донорно-акцепторную Pi-связь, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятерную связь, шестерную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптическую или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (например, катионную пи-связь или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную

связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь или симметричную водородную связь), силу Ван-дер-Ваальса, лондоновскую дисперсионную силу, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийную силу или химическую полярность.

[00118] Используемый в данном документе термин "сайт расщепления" или "сайт ферментативного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. Определенные сайты ферментативного расщепления включают сайт внутриклеточного процессинга. В одном варианте осуществления полипептид содержит сайт ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется во время каскада свертывания крови, так что расщепление таких сайтов происходит в месте образования сгустка. Примеры таких сайтов включают, например, сайты, распознаваемые тромбином, фактором XIa или фактором Ха. Другие сайты ферментативного расщепления известны из уровня техники.

[00119] Используемый в данном документе термин "сайт процессинга" или "сайт внутриклеточного процессинга" относится к типу сайта ферментативного расщепления в полипептиде, который является мишенью для ферментов, функционирующих после трансляции полипептида. В одном варианте осуществления такие ферменты функционируют во время транспорта из полости аппарата Гольджи в транс-отдел аппарата Гольджи. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, сайты, на которые нацеливается семейство PACE/фуриновых (где PACE является аббревиатурой для фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот) эндопептидаз. Эти ферменты локализованы на мембране аппарата Гольджи и расщепляют белки с карбоксиконцевой стороны от мотива последовательности Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. Как используется в данном документе, семейство "фуриновых" ферментов включает, например, PCSK1 (также известный как PC1/PC3), PCSK2 (также известный как PC2), PCSK3 (также известный как фурин или PACE), PCSK4 (также известный как PC4), PCSK5 (также известный как PC5 или PC6), PCSK6 (также известный как PACE4) или PCSK7 (также известный как PC7/LPC, PC8

или SPC7). Другие сайты процессинга известны из уровня техники.

[00120] Следует понимать, что в конструкциях, которые включают более одного сайта процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или разными.

[00121] "Подвергаемый процессингу линкер", как используется в данном документе, относится к линкеру, содержащему по меньшей мере один сайт внутриклеточного процессинга, который описан в данном документе в другом месте.

[00122] "Исходный уровень", как используется в данном документе, представляет собой наиболее низкий измеренный уровень в плазме крови указанного анализируемого вещества, например, фактора свертывания крови (например, FVIII or FIX), у субъекта до введения дозы. Уровни в плазме крови можно измерять в два момента времени до введения дозы: при скрининговом визите и непосредственно перед введением дозы. В качестве альтернативы, (a) исходный уровень у субъектов, у которых активность фактора свертывания крови до лечения составляет $< 1\%$, которые не имеют выявляемого антигена фактора свертывания крови и имеют нонсенс-мутацию в генотипах, может быть определен как 0% , (b) исходный уровень у субъектов с активностью фактора свертывания крови до лечения $< 1\%$, которые имеют выявляемый антиген фактора свертывания крови, может быть установлен как $0,5\%$, (c) исходный уровень у субъектов, у которых активность фактора свертывания крови до лечения составляет $1-2\%$, определяется как C_{min} (наиболее низкая активность на протяжении всего PK-исследования), и (d) исходный уровень у субъектов, у которых активность фактора свертывания крови до лечения составляет $\geq 2\%$, может быть установлен как 2% .

[00123] "Эквивалентная доза", как используется в данном документе, означает ту же самую дозу активности фактора свертывания крови, например, активности FVIII или активности FIX, выраженную в международных единицах независимо от молекулярной массы рассматриваемого полипептида. Например, одна международная единица (ME) активности FVIII соответствует примерно количеству FVIII в одном миллилитре нормальной плазмы крови человека. Доступны несколько анализов для измерения

активности фактора свертывания крови, в том числе анализ с хромогенным субстратом согласно Европейской фармакопее и одностадийный анализ свертывания крови.

[00124] "Интервал между введениями доз", как используется в данном документе, означает количество времени, проходящее между введениями субъекту нескольких доз. Сравнение интервалов между введениями доз можно проводить у одного субъекта или в популяции субъектов, а затем можно рассчитать среднее значение, полученное в популяции.

[00125] "Субъект", как используется в данном документе, означает индивидуума-человека. Субъектом может быть пациент, который в настоящее время страдает от нарушения свертываемости крови или, как ожидается, будет нуждаться в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее никогда не получал лечение фактором свертывания крови (т. е. субъектом является субъект, ранее не получавший лечение, или пациент, ранее не получавший лечение). В некоторых вариантах осуществления субъектом является плод, и способы включают введение композиции, например, химерного полипептида, матери плода, и введение субъекту происходит от матери через плаценту. В некоторых вариантах осуществления субъектом является ребенок или взрослый. В некоторых вариантах осуществления субъектом является ребенок в возрасте менее одного года, менее двух лет, менее трех лет, менее четырех лет, менее пяти лет, менее шести лет, менее семи лет, менее восьми лет, менее девяти лет, менее десяти лет, менее одиннадцати лет или менее двенадцати лет. В некоторых вариантах осуществления ребенок имеет возраст менее одного года. В определенных вариантах осуществления субъект имеет возраст менее 6 лет. В других вариантах осуществления субъект имеет возраст от 6 до менее 12 лет. В других вариантах осуществления субъект имеет возраст 12 лет или больше. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, являющегося ребенком или взрослым, развивается нарушение свертываемости крови, где начало проявления симптомов нарушения свертываемости крови наступает в возрасте от одного года. В некоторых вариантах осуществления введение композиции, например, химерного

полипептида, субъекту является достаточным для предупреждения, ингибирования или снижения темпов развития иммунного ответа, выбранного из гуморального иммунного ответа, клеточноопосредованного иммунного ответа или как гуморального иммунного ответа, так и клеточноопосредованного иммунного ответа на фактор свертывания крови.

[00126] "Терапевтическая доза", "доза", "эффективная доза" или "количество дозы", как используется (взаимозаменяемо) в данном документе, означает дозу, которая обеспечивает достижение терапевтической цели, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическая доза" означает дозу, которая улучшает HJHS, mHJHS или оценку QoL по сравнению с HJHS, mHJHS или оценкой QoL до лечения. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическая доза" означает дозу, которая уменьшает интенсивность опухания, воспаления и/или боли в одном или нескольких суставах у субъекта по сравнению с уровнем опухания, воспаления и/или боли в суставе до лечения. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическая доза" означает дозу, которая уменьшает эффекты и/или степень тяжести одного или нескольких микрокровоотечений по сравнению с эффектами и/или степенью тяжести микрокровоотечения до лечения. В другом варианте осуществления "терапевтическая доза" означает дозу, которая уменьшает степень ремоделирования сосудов в одном или нескольких суставах-мишенях по сравнению с ремоделированием сосудов до лечения.

[00127] Также в настоящее изобретение включены фрагменты или варианты полипептидов и любая их комбинация. Термины "фрагмент" или "вариант" в отношении полипептидов, применяемых в способах согласно настоящему изобретению, включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые из свойств эталонного полипептида (например, вариант Fc или вариант FVIII или FIX с коагуляционной активностью). Фрагменты полипептидов включают фрагменты, полученные посредством протеолиза, а также фрагменты, полученные посредством делеции, в дополнение к конкретным фрагментам антитела, обсуждаемым в данном документе в другом месте, но не включают встречающийся в

природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептидных связывающих доменов или связывающих молекул, применяемых в способах согласно настоящему изобретению, включают фрагменты, описанные выше, а также полипептиды с аминокислотными последовательностями, измененными в результате аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить с помощью известных из уровня техники методик мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления. Один конкретный вариант FIX, раскрытый в данном документе, представляет собой вариант FIX R338L (Padua). См., например, Simioni, P., *et al.*, "X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua)," *NEJM* 361:1671-75 (October 2009), включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00128] "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в уровне техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде замещается другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, то замена считается консервативной. В другом варианте осуществления нить из аминокислот можно подвергнуть консервативному замещению сходной в структурном отношении нитью, которая отличается порядком расположения и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[00129] Термин "процентная идентичность последовательностей" между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей, в окне сравнения с учетом добавлений или делеций (т. е. гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающим положением является любое положение, в котором идентичный нуклеотид или идентичная аминокислота присутствуют как в целевой, так и в эталонной последовательностях. Гэпы, присутствующие в целевой последовательности, не учитываются, поскольку гэпы не представляют собой нуклеотиды или аминокислоты. Аналогично, гэпы, присутствующие в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

[00130] Процентное значение идентичности последовательностей рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичные аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты присутствуют в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно выполнять с применением общедоступного программного обеспечения как для применения онлайн, так и для скачивания. Подходящие программы системы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процентной идентичности последовательностей является `bl2seq`, часть пакета программ BLAST, доступного на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (`blast.ncbi.nlm.nih.gov`). В `Bl2seq` сравнение двух последовательностей выполняется с помощью алгоритма BLASTN

либо BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher, являющиеся частью пакета биоинформатических программ EMBOSS, а также доступные от Европейского института биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[00131] Каждая из разных областей в одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, выравниваемой относительно эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательности, может характеризоваться собственной процентной идентичностью последовательности. Следует отметить, что значение процентной идентичности последовательностей округляют до ближайших десятых. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют в меньшую сторону до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляют в большую сторону до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

[00132] Специалисту в данной области будет понятно, что построение выравнивания последовательностей для расчета процентной идентичности последовательностей не ограничивается бинарными сравнениями двух последовательностей, основанными исключительно на первичных данных о последовательностях. Выравнивания последовательностей можно получить из множественного выравнивания последовательностей. Одной подходящей программой для построения множественного выравнивания последовательностей является ClustalW2, доступная по адресу www.clustal.org. Другой подходящей программой является MUSCLE, доступная по адресу www.drive5.com/muscle/. ClustalW2 и MUSCLE альтернативно доступны, например, от EBI.

[00133] Также следует понимать, что выравнивания последовательностей можно построить с помощью интеграции данных о последовательностях с данными из неоднородных источников, такими как структурные данные (например, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (например, локализация

мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, с помощью которой интегрируют неоднородные данные с построением множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на www.tcoffee.org и альтернативно доступная, например, от EBI. Также следует понимать, что конечное выравнивание, применяемое для расчета процентной идентичности последовательностей, можно проверять либо автоматически, либо вручную.

[00134] Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, не кодирующих областях или как в тех, так и в других. В одном варианте осуществления варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые приводят к "молчащим" заменам, добавлениям или делециям, однако не изменяют свойства или виды активностей кодируемого полипептида. В другом варианте осуществления нуклеотидные варианты получены с помощью "молчащих" замен из-за вырожденности генетического кода. В других вариантах осуществления предусмотрены варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты подвергнуты замене, делеции или добавлению в любой комбинации. Варианты полинуклеотидов можно получать в силу ряда причин, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (замена кодонов в мРНК человека другими, например, кодонами хозяина-бактерии, такого как *E. coli*).

[00135] Встречающиеся в природе варианты называются "аллельными вариантами" и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающей определенный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут отличаться на уровне полинуклеотида и/или полипептида и включены в настоящее изобретение. В качестве альтернативы, не встречающиеся в природе варианты можно получить с помощью методик мутагенеза или путем прямого синтеза.

[00136] С применением известных способов белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК можно создать варианты с улучшением или изменением характеристик полипептидов. Например, одну или несколько аминокислот можно подвергать делеции с N-

конца или С-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. В Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984–2988 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, сообщаются варианты белки KGF, обладающие гепаринсвязывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 аминокислотных остатков на амино-конце. Аналогичным образом, интерферон гамма демонстрировал более высокую, до десятикратной, активность после делеции 8–10 аминокислотных остатков на карбоксильном конце этого белка. (Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199–216 (1988), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00137] Более того, достаточное количество доказательств демонстрирует, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с таковой у встречающегося в природе белка. Например, Gayle и соавторы (*J. Biol. Chem* 268:22105–22111 (1993), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) провели обширный мутационный анализ цитокина IL-1a человека. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 отдельных мутантов IL-1a в среднем с 2,5 аминокислотными заменами на вариант по всей длине молекулы. Множественные мутации исследовали в каждом возможном аминокислотном положении. Исследователи обнаружили, что "[б]ольшая часть молекулы может быть изменена с оказанием небольшого эффекта в отношении [связывания или биологической активности]". (См. реферат.) Фактически только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 исследованных нуклеотидных последовательностей обеспечивали белок, активность которого значительно отличалась от дикого типа.

[00138] Как указано выше, варианты полипептидов включают, например, модифицированные полипептиды. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение компонента-гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное

присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксильное, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (Mei et al., *Blood* 116:270-79 (2010), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование, и убиквитинирование. В некоторых вариантах осуществления FVIII является модифицированным, например, пегилированным, в любом удобном положении. В некоторых вариантах осуществления FVIII является пегилированным по доступной для взаимодействия аминокислоте FVIII, например, по доступному для взаимодействия цистеину, который может представлять собой сконструированный цистеин. Id. В некоторых вариантах осуществления модифицированный FVIII, например, пегилированный FVIII, является химерным или слитым FVIII.

[00139] Термин "ниже" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 3' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. "Ниже" также может относиться к пептидной последовательности, которая расположена с С-концевой стороны от эталонной пептидной последовательности.

[00140] Термин "выше" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 5' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. "Выше" также может относиться к пептидной последовательности, которая расположена с N-концевой стороны от эталонной пептидной последовательности.

[00141] Используемый в данном документе термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие

последовательности) кодирующей области, и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию связанной кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности, узнающие сайты полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторов и структуры "стебель-петля". Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут размещены в направлении 3' относительно кодирующей последовательности.

[00142] Полинуклеотид, который кодирует продукт гена, например, полипептид, может содержать промотор и/или другие элементы, осуществляющие контроль транскрипции или трансляции, функционально связанные с одной или несколькими кодирующими областями. Другие элементы, осуществляющие контроль транскрипции, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально связаны с кодирующей областью для управления экспрессией продукта гена.

[00143] Специалистам в данной области известны разнообразные области, осуществляющие контроль транскрипции. Они включают без ограничения области, осуществляющие контроль транскрипции, функционирующие в клетках позвоночных, такие как без ограничения промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (промотор гена немедленного раннего ответа вместе с интроном А), вируса обезьян 40 (промотор гена раннего ответа) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие области, осуществляющие контроль транскрипции, включают области, полученные из генов позвоночных, таких как гены актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и β -глобина кролика, а также другие последовательности, способные осуществлять контроль экспрессии генов в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие области, осуществляющие контроль транскрипции, включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также индуцируемые лимфокинами промоторы (например, промоторы,

индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

[00144] Аналогично, разнообразные элементы, осуществляющие контроль трансляции, известны средним специалистам в данной области. Они включают без ограничения сайты связывания рибосомы, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, сайт внутренней посадки рибосомы или IRES, также называемый CITE-последовательностью).

[00145] Термин "экспрессия", используемый в данном документе, относится к процессу, посредством которого из полинуклеотида вырабатывается продукт гена, например, РНК или полипептид.

[00146] "Вектор" относится к любому носителю для клонирования нуклеиновой кислоты и/или ее переноса в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты так, чтобы обеспечить репликацию присоединенного сегмента. "Репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует как автономная единица репликации *in vivo*, т. е. способен реплицироваться под своим собственным контролем. Термин "вектор" включает как вирусные, так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В данной области техники известно и используется большое количество векторов, в том числе, например, плазмиды, модифицированные вирусы эукариот или модифицированные вирусы бактерий. Вставка полинуклеотида в подходящий вектор может быть осуществлена посредством лигирования соответствующих полинуклеотидных фрагментов в выбранный вектор, который имеет комплементарные "липкие" концы.

[00147] Термин "плаزمид" относится к внехромосомному элементу, зачастую несущему ген, который не является частью центрального метаболизма клетки, и обычно имеющему форму кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, интегрирующиеся в геном последовательности, фаговые или нуклеотидные последовательности, линейные, кольцевые или

суперспиральные, из одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, полученных из любого источника, в которых ряд нуклеотидных последовательностей был соединен или рекомбинирован в уникальную конструкцию, которая способна вводить промоторный фрагмент и последовательность ДНК, кодирующую выбранный продукт гена, вместе с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью в клетку.

[00148] Векторы на основе вирусов эукариот, которые можно применять, включают без ограничения векторы на основе аденовируса, векторы на основе ретровируса, векторы на основе аденоассоциированного вируса и векторы на основе поксвируса, например, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе бакуловируса или векторы на основе герпесвируса. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры.

[00149] "Клонировующий вектор" относится к "репликону", который представляет собой нуклеиновую кислоту единичной длины, которая реплицируется последовательно и которая содержит точку начала репликации, такую как плаزمид, фаг или космоид, к которой может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты так, чтобы обеспечить репликацию присоединенного сегмента. Определенные клонирующие векторы способны реплицироваться в одном типе клеток, например, бактериях, а экспрессироваться в другом, например, эукариотических клетках. Клонировующие векторы обычно содержат одну или несколько последовательностей, которые можно применять для отбора клеток, содержащих вектор, и/или один или несколько сайтов множественного клонирования для вставки последовательностей нуклеиновых кислот, представляющих интерес.

[00150] Термин "вектор экспрессии" относится к носителю, сконструированному с возможностью обеспечения экспрессии вставленной последовательности нуклеиновой кислоты после введения в клетку-хозяина. Вставленная последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи с регуляторными областями, как описано выше.

[00151] Векторы вводят в клетки-хозяева с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, например, посредством трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, DEAE-декстрана, осаждения фосфатом кальция, липофекции (слияния лизосом), применения генной пушки или транспортера ДНК-вектора.

[00152] "Выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или производное относятся к полипептиду, который не находится в своем естественном окружении. Никакого конкретного уровня очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть просто извлечен из его нативной или природной среды. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессирующиеся в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, равно как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или в значительной степени очищены с помощью любой подходящей методики.

[00153] Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке или популяции клеток, содержащих или способных содержать рекомбинантную нуклеиновую кислоту. Клетками-хозяевами могут быть прокариотические клетки (например, *E. coli*), или, в качестве альтернативы, клетками-хозяевами могут быть эукариотические клетки, например, клетки грибов (например, клетки дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Schizosaccharomyces pombe*) и различные клетки животных, такие как клетки насекомых (например, Sf-9) или клетки млекопитающих (например, HEK293F, CHO, COS-7, NIH-3T3).

[00154] "Объем распределения в равновесном состоянии (Vss)", как используется в данном документе, имеет то же значение, что и термин, используемый в области фармакологии, который означает кажущееся пространство (объем), в котором распределяется лекарственное средство. V_{ss} = количество лекарственного средства в организме, деленное на концентрацию в плазме крови в равновесном состоянии.

II. СПОСОБЫ СОГЛАСНО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[00155] Настоящее изобретение основывается на обнаружении

того, что фактор свертывания крови, слитый с Fc-областью, можно применять для обеспечения регрессии гемофилической артропатии. Ранее было известно, что гемофилическая артропатия является необратимой с момента развития, поскольку изменения мягких тканей можно было только визуализировать с помощью MRI. Известные в настоящее время варианты для индивидуума, страдающего гемофилической артропатией, включают хирургическую операцию или применение склерозирующего средства для удаления гипертрофированной синовиальной оболочки. Склерозирующее средство, будь то радиоактивный либо химический материал, может препятствовать дальнейшему износу хрящевой и костной ткани; тем не менее, оно не способно обеспечивать регрессию гемофилической артропатии. Артропластика коленного и тазобедренного сустава была успешной в уменьшении интенсивности боли и ограничения движений, тогда как другие попытки контроля гипертрофии синовиальной оболочки потерпели неудачу. Hilgartner M., Current Opinion in Pediatrics: February 2002, V14, Issue 1, pp. 46-49.

[00156] В настоящем изобретении, таким образом, предусмотрены способы лечения гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающие введение человеку эффективного количества композиции, например, химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или полинуклеотида, кодирующего химерный белок. Лечение гемофилической артропатии может обеспечивать частичную или полную регрессию гемофилической артропатии (например, одного или нескольких симптомов гемофилической артропатии). Таким образом, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения человека, имеющего гемофилию, у которого уже развилась гемофилическая артропатия, например, синовит.

[00157] В целом, гемофилическая артропатия относится к заболеванию суставов, которое имеет место у субъекта-человека, страдающего гемофилией, в качестве долгосрочного последствия повторного кровотечения в суставы субъекта. У пациентов с гемофилией распространенным является спонтанное кровотечение в один или несколько суставов. Суставы, в которых происходит

несколько последовательных кровоточений в течение 6-месячного периода, часто называются "суставами-мишенями", и в этих суставах часто наблюдается прогрессирующее до гемофилической артропатии.

[00158] Гемофилическая артропатия может проявляться в виде различных симптомов, включающих без ограничения гиперплазию синовиальной оболочки, хроническое воспаление (в том числе синовит), фиброз, гемосидероз, образование субартикулярных кист, боль, уменьшение объема движений, атрофию мышц, анкилоз, остеопороз, дегенерацию хряща с сужением суставной щели и любую их комбинацию. Гемофилическая артропатия включает различные стадии: (i) стадию I, включающую опухание мягких тканей, но без скелетных аномалий; (ii) стадию II, включающую разрастание и остеопороз эпифиза с сохранением целостности сустава. Отсутствуют костные кисты и сужение хрящевой щели сустава. Рентгенологическая стадия II соответствует клинической стадии подострой гемофилической артропатии; (iii) стадию III, включающую сужение суставной щели от минимального до умеренного с субхондральными кистами. Расширение межмышцелковой вырезки коленного сустава и блоковидной вырезки локтевой кости. В коленном суставе надколенник может приобретать квадратную форму. Суставной хрящ по-прежнему сохраняется, и гемофилическая артропатия по-прежнему является обратимой; (iv) стадию IV, включающую разрушение суставного хряща с сильным сужением суставной щели. Другие костные изменения, обнаруживаемые на стадии III, являются более выраженными; и (v) стадию V, включающую полную потерю суставной щели с фиброзным анкилозом сустава. Наблюдается заметное несоответствие суставных структур при наличии сильной неравномерной гипертрофии эпифиза.

[00159] В настоящем изобретении предусмотрено, что лечение с помощью композиции, например, химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, может ослаблять симптомы обратимой гемофилической артропатии и/или уменьшать их интенсивность. В некоторых вариантах осуществления с помощью композиции, например, химерного белка, можно лечить гемофилическую артропатию на одной или нескольких стадиях,

например, на стадиях I, II и/или III. Как используется в данном документе, "обратимая" гемофилическая артропатия представляет собой проявление гемофилической артропатии, которое может частично или полностью регрессировать до исходного здорового состояния после лечения. В отличие от этого, "необратимая" гемофилическая артропатия представляет собой проявление гемофилической артропатии, которое является постоянным и которое не будет улучшаться после лечения. Таким образом, способы согласно настоящему изобретению могут обеспечивать улучшение, ослабление или уменьшение интенсивности (или частичную либо полную регрессию) одного или нескольких симптомов гемофилической артропатии, например, гиперплазии синовиальной оболочки, хронического воспаления (в том числе синовита), гемосидероза, образования субартикулярных кист, боли, уменьшения объема движений, опухания, ремоделирования сосудов или любой их комбинации.

[00160] Гемофилическая артропатия (обратимая), которую лечат с помощью способов согласно настоящему изобретению, может поражать любой сустав в организме. В некоторых вариантах осуществления сустав представляет собой сустав, несущий нагрузку, например, сустав, выбранный из группы, состоящей из одного или обоих коленных суставов, одного или обоих голеностопных суставов, одного или обоих тазобедренных суставов, одного или нескольких суставов стопы и любой их комбинации. В другом варианте осуществления сустав представляет собой сустав, не несущий нагрузку, например, сустав, выбранный из группы, состоящей из одного или обоих локтевых суставов, одного или обоих плечевых суставов, одного или обоих лучезапястных суставов, одного или нескольких суставов кисти руки или любой их комбинации. В другом варианте осуществления сустав представляет собой коленный сустав.

[00161] В некоторых вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия включает синовит. Синовит относится к воспалению синовиальной оболочки, которая окружает сустав. В некоторых вариантах осуществления синовит имеет место в любом суставе в организме. В некоторых вариантах осуществления синовит

проявляется в виде опухания сустава, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение интенсивности опухания сустава. В некоторых вариантах осуществления синовит проявляется в виде боли в суставе, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение интенсивности боли в суставе. В других вариантах осуществления синовит проявляется в виде уменьшения объема движений в суставе, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают увеличение объема движений в суставе.

[00162] В других вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия включает микрокровоотечение в суставе. В некоторых вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия является результатом микрокровоотечения. Микрокровоотечение относится к очень небольшому кровоотечению в одном или нескольких суставах, которое может привести к гемофилической артропатии после повторных случаев. В некоторых вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия включает острое суставное кровоотечение. В некоторых вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия является результатом острого суставного кровоотечения. Острое суставное кровоотечение относится к более существенному эпизоду кровоотечения в одном или нескольких суставах.

[00163] В определенных вариантах осуществления обратимая гемофилическая артропатия включает воспаление одного или нескольких суставов. В некоторых вариантах осуществления воспаление имеет место в любом суставе в организме. В некоторых вариантах осуществления воспаление проявляется в виде опухания сустава, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение интенсивности опухания сустава. В некоторых вариантах осуществления воспаление проявляется в виде боли в суставе, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение интенсивности боли в суставе. В других вариантах осуществления воспаление проявляется в виде уменьшения объема движений в суставе, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают увеличение объема движений в суставе. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает измерение

интенсивности воспаления в одном или нескольких суставах до введения эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает измерение интенсивности воспаления в одном или нескольких суставах после введения эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область.

[00164] В других вариантах осуществления гемофилическая артропатия подтверждается экспрессией одного или нескольких биомаркеров, ассоциированных с воспалением суставов и/или повреждением суставов. В некоторых вариантах осуществления у человека повышена экспрессия одного или нескольких биомаркеров, что указывает на увеличение интенсивности воспаления суставов и/или повреждения суставов. В некоторых вариантах осуществления у человека понижена экспрессия одного или нескольких биомаркеров, что указывает на увеличение интенсивности воспаления суставов и/или повреждения суставов. В некоторых вариантах осуществления человека, нуждающегося в лечении, идентифицируют на основании экспрессии одного или нескольких биомаркеров, ассоциированных с увеличенной восприимчивостью к лечению с помощью способов согласно настоящему изобретению.

[00165] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают увеличение степени локализации фактора свертывания крови в одном или нескольких суставах-мишенях. В определенных вариантах осуществления композиция или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, локализуются в суставе-мишени после введения в большей степени, чем фактор свертывания крови в отдельности. В определенных вариантах осуществления композиция или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, после введения остаются локализованными в одном или нескольких суставах-мишенях в течение более длительного периода времени, чем фактор свертывания крови в отдельности.

[00166] В еще нескольких других вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают

идентификацию субъекта, у которого проявляются один или несколько маркеров обратимой гемофилической артропатии, а затем введение композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область.

[00167] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают предупреждение или снижение частоты возникновения ремоделирования сосудов в суставе человека, имеющего гемофилию. Распространенным элементом, ассоциированным с гемофилической артропатией, является ремоделирование сосудистой сети, окружающей сустав, в частности сустав-мишень. Ремоделирование сосудов может характеризоваться увеличением интенсивности ангиогенеза и увеличением частоты возникновения микрокровотечений в сустав. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ профилактического лечения или снижения частоты возникновения ремоделирования сосудов в суставе человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения регрессии имеющегося ремоделирования сосудов, ассоциированного с гемофилической артропатией, в суставе человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления ремоделирование сосудов имеет место в любом суставе в организме. В определенных вариантах осуществления ремоделирование сосудов имеет место в суставе-мишени. В других вариантах осуществления ремоделирование сосудов имеет место в суставе, отличном от сустава-мишени. В определенных вариантах осуществления ремоделирование сосудов имеет место в суставе, несущем нагрузку, например, в суставе, выбранном из группы, состоящей из одного или обоих коленных суставов, одного или обоих голеностопных суставов, одного или обоих тазобедренных суставов, одного или нескольких суставов стопы и любой их комбинации. В другом варианте осуществления ремоделирование сосудов имеет место в суставе, не несущем

нагрузку, например, в суставе, выбранном из группы, состоящей из одного или обоих локтевых суставов, одного или обоих плечевых суставов, одного или обоих лучезапястных суставов, одного или нескольких суставов кисти руки или любой их комбинации. В другом варианте осуществления ремоделирование сосудов имеет место в коленном суставе. В некоторых вариантах осуществления ремоделирование сосудов имеет место в мышце. В некоторых вариантах осуществления ремоделирование сосудов имеет место в селезенке и/или печени.

[00168] В определенных вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают улучшение состояния мягких тканей, окружающих сустав, у человека, имеющего гемофилию. Другой распространенной патологией при гемофилической артропатии является гиперпролиферация мягких тканей сустава. В некоторых вариантах осуществления мягкие ткани, состояние которых улучшается с помощью способов согласно настоящему изобретению, находятся в любом суставе организма. В определенных вариантах осуществления мягкие ткани, состояние которых улучшается с помощью способов согласно настоящему изобретению, находятся в суставе-мишени. В других вариантах осуществления мягкие ткани, состояние которых улучшается с помощью способов согласно настоящему изобретению, находятся в суставе, отличном от сустава-мишени.

[00169] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение степени тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с гиперпролиферацией мягких тканей сустава. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферация мягких тканей сустава проявляется в виде опухания сустава, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение интенсивности опухания сустава. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферация мягких тканей сустава проявляется в виде боли в суставе, и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают уменьшение интенсивности боли в суставе. В других вариантах осуществления гиперпролиферация мягких тканей сустава проявляется в виде уменьшения объема движений в суставе, и

способы согласно настоящему изобретению обеспечивают увеличение объема движений в суставе.

[00170] Способы, раскрытые в данном документе, можно осуществлять на практике в отношении субъекта, который получал лечение и продемонстрировал уменьшение интенсивности проявлений гемофилической артропатии, для предупреждения дальнейшего развития гемофилической артропатии одного или нескольких суставов. В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению применяют в отношении субъекта для лечения имеющейся гемофилической артропатии одного или нескольких суставов и для предупреждения дальнейшего развития гемофилической артропатии в том же самом или в другом суставе.

[00171] В некоторых вариантах осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает возможность распределения фактора свертывания крови в тканях вне плазменного компартмента, а также в плазменном компартменте.

[00172] Способы согласно настоящему изобретению обеспечивают улучшение функционального состояния суставов в одном или нескольких суставах у человека, имеющего гемофилию. Функциональное состояние суставов можно определить с помощью любых количественных показателей, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления функциональное состояние суставов определяют с помощью системы оценки функционального состояния суставов при гемофилии (HJHS) (см. Feldman et al., "Hemophilia Joint Health Score (HJHS) 2.1", доступную по адресу <http://www.wfh.org/en/page.aspx?pid=885> (дата последнего обращения 18 ноября 2016 г.), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). С помощью HJHS измеряют функциональное состояние суставов в домене функций и структур организма (т. е. его ухудшение) для суставов, наиболее часто поражаемых кровотечением при гемофилии: коленных суставов, голеностопных суставов и локтевых суставов. Хотя изначально она была предназначена для детей с гемофилией в возрасте 4–18 лет с легким ухудшением функции суставов (например, получающих профилактическое лечение), ее можно применять в отношении любой популяции. В некоторых вариантах осуществления с помощью HJHS

измеряют опухание, длительность (опухания), атрофию мышц, хруст при движении, ограничение сгибания, ограничение разгибания, суставную боль и силу для каждого из левого и правого локтевых суставов, левого и правого коленных суставов и левого и правого голеностопных суставов у человека, имеющего гемофилию. В некоторых вариантах осуществления каждому параметру назначают оценку в баллах. В одном конкретном варианте осуществления для определения функционального состояния суставов используют стандартную HJHS версии 2.1. В некоторых вариантах осуществления опухание оценивают в баллах от 0 до 3, при этом 0 означает отсутствие опухания, а 3 означает сильное опухание. В некоторых вариантах осуществления длительность опухания оценивают в баллах от 0 до 1, при этом 0 означает отсутствие опухания или опухание в течение периода менее 6 месяцев, а 1 означает опухание в течение периода, превышающего или составляющего 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления атрофию мышц оценивают в баллах от 0 до 2, при этом 0 означает отсутствие атрофии, а 2 означает сильную атрофию. В некоторых вариантах осуществления хруст при движении оценивают в баллах от 0 до 2, при этом 0 означает отсутствие хруста при движении, а 2 означает сильный хруст при движении. В некоторых вариантах осуществления ограничение сгибания оценивают в баллах от 0 до 3, при этом 0 означает ограничение сгибания менее чем на 5° , а 3 означает ограничение сгибания более чем на 20° . В некоторых вариантах осуществления ограничение разгибания оценивают в баллах от 0 до 3, при этом 0 означает ограничение разгибания менее чем на 5° , а 3 означает ограничение разгибания более чем на 20° . В некоторых вариантах осуществления суставную боль оценивают в баллах от 0 до 2, при этом 0 означает отсутствие боли в пределах объема активных движений, а 2 означает наличие боли в пределах объема активных движений. В некоторых вариантах осуществления определяют комплексную оценку походки, при этом 0 отражает то, что все навыки находятся в пределах нормы; 1, 2 и 3 отражают то, что соответственно 1, 2 и 3 навыка не находятся в пределах нормы; а 4 отражают то, что ни один навык не находится в пределах нормы. В определенных вариантах осуществления

комплексную оценку походки определяют на основании оценивания ходьбы, подъема по лестнице, бега или подскоков на одной ноге. В некоторых вариантах осуществления оценки суммируют с получением общей оценки. В других вариантах осуществления отдельные оценки для одного или нескольких суставов оценивают как указание на функциональное состояние одного или нескольких суставов.

[00173] В других вариантах осуществления для определения функционального состояния суставов используют модифицированную систему HJHS. В некоторых вариантах осуществления mHJHS отличается от стандартной HJHS версии 2.1 тем, что возможные варианты ответа при оценивании суставной боли и походки были сведены в меньшее количество категорий, была добавлена оценка нестабильности, и общая оценка является более низкой (в диапазоне 0–116; 0 указывает на нормальное функционирование сустава, 116 указывает на тяжелое заболевание) по сравнению со стандартной HJHS (в диапазоне 0–124). Оценки, которым предшествовало кровотечение в рамках периода 2 недель, исключали. Оценки для суставов, которые подвергались хирургическому вмешательству, подставляли условно с помощью метода переноса данных последнего наблюдения вперед. Для оценивания изменения по годам в этот апостериорный анализ были включены субъекты из расширенного исследования rFVIIIFc, для которых имелись данные mHJHS в 4 момента времени (на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3, на исходном уровне в расширенном исследовании rFVIIIFc, в год 1 в расширенном исследовании rFVIIIFc и в год 2 в расширенном исследовании rFVIIIFc). Изменение оценки mHJHS от исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до года 2 в расширенном исследовании rFVIIIFc (отрицательное значение указывает на улучшение) суммировали с помощью описательной статистики. Изменение оценки mHJHS от исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до визитов последующего наблюдения суммировали по: (1) общей оценке (диапазон 0–116; по режиму лечения до исследования (профилактическому в сравнении с эпизодическим); по степени тяжести ухудшения функции, определенной на основании исходной mHJHS, и по наличию суставов–

мишеней на исходном уровне); (2) суставам-мишеням (диапазон 0-19: сумма баллов по всем вопросам для одного сустава-мишени); (3) опорным (например, голеностопному и коленному) и неопорным (например, локтевому) суставам (диапазон 0-38: сумма для правого и левого суставов в одном местоположении) и (4) отдельным компонентам (объему движений (диапазон 0-36: совокупный балл по вопросам об "ограничении разгибания [тыльного сгибания в голеностопных суставах]" и "ограничении сгибания [подошвенного сгибания в голеностопных суставах]" для всех суставов); опуханию (диапазон 0-24: совокупный балл по вопросам об "опухании" и "длительности опухания" для всех суставов) и силе (диапазон 0-6: сумма для всех суставов)).

[00174] В некоторых вариантах осуществления оценивание суставов выполняют по отдельности для 6 суставов (левого голеностопного сустава LA, правого голеностопного сустава RA, левого локтевого сустава LE, правого локтевого сустава RE, левого коленного сустава LK, правого коленного сустава RK). В некоторых вариантах осуществления опухание оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное. В некоторых вариантах осуществления длительность опухания оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствие опухания или ≤ 6 месяцев; 1 = >6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления атрофию мышц оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствует; 1=легкая; 2=сильная. В некоторых вариантах осуществления хруст при движении оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствует; 1=присутствует. В некоторых вариантах осуществления ограничение сгибания, в том числе ограничение подошвенного сгибания в голеностопных суставах, оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное. В некоторых вариантах осуществления ограничение разгибания, в том числе ограничение тыльного сгибания в голеностопных суставах, оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное. В некоторых вариантах осуществления нестабильность оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствует; 1=значительная патологическая гиперподвижность сустава. В

некоторых вариантах осуществления суставную боль оценивают в соответствии со следующим: 0=отсутствие боли в пределах объема либо в конечной точке объема движений; 1=наличие боли. В некоторых вариантах осуществления силу оценивают в соответствии со следующим: 0=нормальная (положение удерживается с преодолением силы тяжести и максимального сопротивления); 1=минимальное уменьшение (положение удерживается с преодолением силы тяжести и умеренного сопротивления, но не максимального сопротивления); 2=легкое уменьшение (положение удерживается с преодолением силы тяжести или минимального сопротивления); 3=умеренное уменьшение (способность выполнять движения в суставе при устранении силы тяжести); 4=сильное уменьшение (остаточное или отсутствующее мышечное сокращение). В определенных вариантах осуществления для оценивания ограничения сгибания и ограничения разгибания в коленных суставах и локтевых суставах применимо следующее: отсутствует=примерно 0–5 градусов; легкое=примерно 5–10 градусов; умеренное=примерно 11–20 градусов и сильное=примерно > 20 градусов.

[00175] В некоторых вариантах осуществления походку оценивают однократно (диапазон 0–2), где 0=отсутствие трудностей при ходьбе или подъеме/спуске по лестнице; 1=отсутствие трудностей при ходьбе, но наличие трудностей при перемещении по лестнице; и 2=трудности при ходьбе и при перемещении по лестнице.

[00176] В определенных вариантах осуществления оценивание суставов выполняют по отдельности для 6 суставов (левого голеностопного сустава LA, правого голеностопного сустава RA, левого локтевого сустава LE, правого локтевого сустава RE, левого коленного сустава LK, правого коленного сустава RK) в соответствии со следующими категориями и шкалами (диапазон 0–19 для каждого сустава и 0–114 для всех шести суставов): опухание (0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное); длительность опухания (0=отсутствие опухания или ≤ 6 месяцев; 1 = >6 месяцев); атрофия мышц (0=отсутствует; 1=легкая; 2=сильная); хруст при движении (0=отсутствует; 1=присутствует); ограничение сгибания, в том числе ограничение подошвенного сгибания в

голеностопных суставах (0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное); ограничение разгибания, в том числе ограничение тыльного сгибания в голеностопных суставах (0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное); нестабильность (0=отсутствует; 1=значительная патологическая гиперподвижность сустава); суставная боль (0=отсутствие боли в пределах объема либо в конечной точке объема движений; 1=наличие боли); сила (0=нормальная (положение удерживается с преодолением силы тяжести и максимального сопротивления); 1=минимальное уменьшение (положение удерживается с преодолением силы тяжести и умеренного сопротивления, но не максимального сопротивления); 2=легкое уменьшение (положение удерживается с преодолением силы тяжести или минимального сопротивления); 3=умеренное уменьшение (способность выполнять движения в суставе при устранении силы тяжести); 4=сильное уменьшение (остаточное или отсутствующее мышечное сокращение); где для оценивания ограничения сгибания и ограничения разгибания в коленных суставах и локтевых суставах применимо следующее: отсутствует=примерно 0–5 градусов; легкое=примерно 5–10 градусов; умеренное=примерно 11–20 градусов и сильное=примерно >20 градусов.

[00177] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, где в результате введения у человека улучшается оценка HJHS по сравнению с оценкой HJHS до введения. В некоторых вариантах осуществления оценка HJHS является общей оценкой HJHS, которая включает сумму оценок, определенных для всех суставов, и комплексную оценку походки. В некоторых вариантах осуществления оценка HJHS является общей оценкой HJHS, которая включает сумму оценок, определенных для всех суставов, без комплексной оценки походки. В других вариантах осуществления оценка HJHS применима для одного или обоих локтевых суставов, одного или обоих коленных суставов, одного или обоих голеностопных суставов или любой их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления

оценка HJHS применима для локтевого сустава. В другом варианте осуществления оценка HJHS применима для коленного сустава. В другом варианте осуществления оценка HJHS применима для голеностопного сустава. В другом варианте осуществления оценка HJHS отражает комплексную оценку походки.

[00178] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, где в результате введения у человека уменьшается интенсивность суставной боли. В некоторых вариантах осуществления интенсивность суставной боли уменьшается по сравнению с суставной болью до введения. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает измерение интенсивности суставной боли в одном или нескольких суставах до введения эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает измерение интенсивности суставной боли в одном или нескольких суставах после введения эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область.

[00179] В определенных вариантах осуществления эффекты способов согласно настоящему изобретению наблюдаются в одном или нескольких суставах человека. В некоторых вариантах осуществления эффекты способов согласно настоящему изобретению наблюдаются в по меньшей мере одном суставе. В некоторых вариантах осуществления эффекты способов согласно настоящему изобретению наблюдаются в по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти или по меньшей мере десяти суставах.

[00180] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают идентификацию человека, нуждающегося в лечении, например,

идентификацию субъекта, имеющего гемофилическую артропатию. Гемофилическую артропатию можно выявлять и/или отслеживать с помощью любых способов, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления для выявления и/или отслеживания гемофилической артропатии у субъекта используют систему визуализации. В некоторых вариантах осуществления система визуализации включает любую систему визуализации, известную из уровня техники, которая используется для получения характеристик суставов. Например, в определенных вариантах осуществления система визуализации включает систему для рентгенографии, магнитно-резонансной томографии, ультразвукового исследования, энергетической ультразвуковой доплерографии или любой их комбинации.

[00181] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение белковым фактором свертывания крови, не слитым с Fc-частью. Этот фактор свертывания крови может представлять собой полноразмерный или зрелый фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления такой фактор свертывания крови может представлять собой ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI®, AFSTYLA®, а также NYATE:C®, IDELVION®.

II.A. Химерные белки

[00182] Способы лечения обратимой гемофилической артропатии, раскрытые в данном документе, предусматривают общеприменимые химерные белки или композиции, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, где фактор свертывания крови может представлять собой любой известный фактор свертывания крови, его фрагмент или его вариант, и где Fc-область может представлять собой любую известную Fc-область, ее фрагмент или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из фактора VII (FVII), фактора VIIa (FVIIa), фактора VIII (FVIII), фактора IX (FIX), фактора X (FX), фактора фон Виллебранда (VWF) или любой

их комбинации. Соответственно, настоящее изобретение, относящееся к химерным полипептидам FVIII_{FC} и FIX_{FC} и путям их применения, в равной степени применимо к другим химерным полипептидам, содержащим часть, представляющую собой фактор свертывания крови, и Fc-часть. Любой фактор свертывания крови, или любой его фрагмент, или любой его вариант могут применяться в способах согласно настоящему изобретению.

[00183] Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что Fc-область, слитая с фактором свертывания крови, является применимой в лечении обратимой гемофилической артропатии. Воспаление при гемофилии возникает при кровотечении в суставы. Было показано, что TNF- α , провоспалительный цитокин, вовлеченный в гемофилическую артропатию, индуцирует передачу сигнала через NF- κ B и тем самым повышает экспрессию FcRn в моноцитах человека (Liu et al., *J Immunol*, 2007. 179(5): p. 2999-3011). Экспрессия FcRn, таким образом, может повышаться в очагах воспаления, что позволяет Fc-содержащим белкам локализоваться в очагах воспаления благодаря связыванию с Fc-рецепторами в качестве части регуляции воспалительных процессов. Fc-область, слитая с фактором свертывания крови, также может взаимодействовать с ингибирующими Fc-рецепторами, которые могут обуславливать иммуномодуляцию и деактивацию провоспалительных сигнальных путей. Например, rFVIII_{FC} может блокировать неонатальный Fc-рецептор (FcRn) и активировать Fc γ -рецепторы (Fc γ R), что приводит к изменению уровней про- и противовоспалительных молекул. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Fc-область химерного белка облегчает локализацию химерного белка в суставе, например, в очаге воспаления, и/или поражения, и/или повреждения.

[00184] В других вариантах осуществления фактором свертывания крови может быть имитатор фактора свертывания крови. Имитаторы фактора свертывания крови могут проявлять один или несколько видов активности фактора свертывания крови. Например, антитело или его связывающая часть антитела могут действовать как FVIII путем связывания как с фактором IX, так и фактором X. Такие антитела или их антигенсвязывающие части можно применять

для способов согласно настоящему изобретению, если антитела или их антигенсвязывающие части содержат Fc-область. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой пептид, который обладает активностью FVIII.

[00185] В этом отношении в настоящем изобретении в целом предусмотрен способ лечения обратимой гемофилической артропатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту химерного полипептида, содержащего часть, представляющую собой фактор свертывания крови, и Fc-часть.

II.A.1. Фактор VIII

[00186] "Фактор VIII", сокращенно называемый во всей настоящей заявке как "FVIII", как используется в данном документе, означает функциональный полипептид FVIII с его нормальной ролью в коагуляции, если не указано иное. Таким образом, термин "FVIII" включает варианты полипептиды, которые являются функциональными. "Белок FVIII" используется взаимозаменяемо с полипептидом (или белком) FVIII или FVIII. Примеры функций FVIII включают без ограничения способность активировать коагуляцию, способность действовать в качестве кофактора для фактора IX или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов, который затем обеспечивает превращение фактора X в активированную форму Xa. Белок FVIII может представлять собой белок FVIII человека, свиньи, собаки, крысы или мыши. Кроме того, путем сравнения FVIII от людей и FVIII от других видов идентифицировали консервативные остатки, которые, вероятно, необходимы для функционирования (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6251632). Известны полноразмерные полипептидные и полинуклеотидные последовательности, как и многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные варианты. Различные аминокислотные и нуклеотидные последовательности FVIII раскрыты, например, в публикациях заявок на патент США №№ 2015/0158929 A1, 2014/0308280 A1 и 2014/0370035 A1, а также в международной публикации № WO 2015/106052 A1, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте. Полипептиды FVIII включают в себя, например, полноразмерный FVIII, полноразмерный

FVIII без Met на N-конце, зрелый FVIII (без сигнальной последовательности), зрелый FVIII с дополнительным Met на N-конце и/или FVIII с полной или частичной делецией домена В. Варианты FVIII содержат делеции домена В, будь то частичные или полные делеции.

[00187] В некоторых вариантах осуществления FVIII в химерном белке или композиции согласно настоящему изобретению включает в себя FVIII с делецией домена В. "Домен В" в FVIII, как используется в данном документе, является тем же доменом В, известным из уровня техники, который определяют по идентичности внутренней аминокислотной последовательности и сайтам протеолитического расщепления тромбином, например, остаткам Ser741-Arg1648 зрелого FVIII человека. Другие домены FVIII человека определяют по следующим аминокислотным остаткам относительно зрелого FVIII человека: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; A3, остатки Ser1690-Ile2032; C1, остатки Arg2033-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332 зрелого FVIII. Номера остатков последовательности, используемые в данном документе, без ссылки на какие-либо номера SEQ ID соответствуют последовательности FVIII без последовательности сигнального пептида (19 аминокислот), если не указано иное. Последовательность A3-C1-C2, также известная как тяжелая цепь FVIII, включает в себя остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшаяся последовательность, остатки Glu1649-Arg1689, обычно относится к активационному пептиду легкой цепи FVIII. Из уровня техники также известны местоположения границ всех доменов, в том числе доменов В, для FVIII свиньи, мыши и собаки. В одном варианте осуществления домен В FVIII удален посредством делеции ("FVIII с делецией домена В" или "BDD FVIII"). Примером BDD FVIII является REFACTO® (рекомбинантный BDD FVIII). В одном конкретном варианте осуществления вариант FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 746-1648 зрелого FVIII.

[00188] "FVIII с делецией домена В" может характеризоваться полной или частичной делециями, раскрытыми в патентах США №№ 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и

6458563 и в международной публикации № WO 2015106052 A1 (PCT/US2015/010738). В некоторых вариантах осуществления последовательность FVIII с делецией домена В, применяемая в способах согласно настоящему изобретению, содержит любую из делеций, раскрытых от столбца 4, строки 4 до столбца 5, строки 28 и в примерах 1-5 патента США № 6316226 (также в US 6346513). В другом варианте осуществления фактор VIII с делецией домена В представляет собой фактор VIII с делецией домена В S743/Q1638 (SQ BDD FVIII) (например, фактор VIII, имеющий делецию от аминокислоты 744 до аминокислоты 1637, например, фактор VIII, содержащий аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 зрелого FVIII). В некоторых вариантах осуществления FVIII с делецией домена В, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, имеет делецию, раскрытую в столбце 2, строках 26-51 и в примерах 5-8 патента США № 5789203 (также в US 6060447, US 5595886 и US 6228620). В некоторых вариантах осуществления фактор VIII с делецией домена В имеет делецию, раскрытую от столбца 1, строки 25 до столбца 2, строки 40 в патенте США № 5972885; в столбце 6, строках 1-22 и в примере 1 патента США № 6048720; в столбце 2, строках 17-46 патента США № 5543502; от столбца 4, строки 22 до столбца 5, строки 36 патента США № 5171844; в столбце 2, строках 55-68, на фигуре 2 и в примере 1 патента США № 5112950; от столбца 2, строки 2 до столбца 19, строки 21 и в таблице 2 патента США № 4868112; от столбца 2, строки 1 до столбца 3, строки 19, от столбца 3, строки 40 до столбца 4, строки 67, от столбца 7, строки 43 до столбца 8, строки 26 и от столбца 11, строки 5 до столбца 13, строки 39 патента США № 7041635 или в столбце 4, строках 25-53 патента США № 6458563. В некоторых вариантах осуществления FVIII с делецией домена В имеет делецию большей части домена В, но все еще содержит аминоконцевые последовательности домена В, которые необходимы для протеолитического процессинга *in vivo* первичного продукта трансляции в две полипептидные цепи, как раскрыто в WO 91/09122. В некоторых вариантах осуществления FVIII с делецией домена В конструируют с делецией аминокислот 747-1638, т. е. практически с полной делецией домена В. Noeben R.C., et al. J.

Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Фактор VIII с делецией домена В также может содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 FVIII. Meulien P., et al. *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988). Дополнительные делеции домена В, которые являются частью настоящего изобретения, включают делецию аминокислот 982-1562 или 760-1639 (Toole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942)), 797-1562 (Eaton, et al. *Biochemistry* (1986) 25:8343-8347)), 741-1646 (Kaufman (опубликованная заявка согласно РСТ № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., *DNA* (1987) 6:553-564)), 741-1648 (Pasek (заявка согласно РСТ № 88/00831)), или 816-1598, или 741-1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)). В одном конкретном варианте осуществления FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 746-1648 зрелого FVIII. В другом варианте осуществления FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 745-1648 зрелого FVIII.

[00189] В других вариантах осуществления BDD FVIII включает в себя полипептид FVIII, содержащий фрагменты домена В, в которых сохранены один или несколько сайтов N-связанного гликозилирования, например, остатки 757, 784, 828, 900, 963 или необязательно 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности FVIII. Примеры фрагментов домена В включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты из домена В, как раскрыто в Miao, H.Z., et al., *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A, et al., *J. Thromb. Haemost.* 6. 1352-1359 (2008) и Pipe, S.W., et al., *J. Thromb. Haemost.* 9. 2235-2242 (2011) (т. е. первые 226 аминокислот или 163 аминокислоты из домена В сохранены). В еще нескольких вариантах осуществления BDD FVIII дополнительно содержит точечную мутацию в остатке 309 (из Phe в Ser) для улучшения экспрессии белка BDD FVIII. См. Miao, H.Z., et al., *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004). В еще нескольких вариантах осуществления BDD FVIII включает в себя полипептид FVIII, содержащий часть домена В, но не содержащий один или несколько сайтов расщепления фурином (например, Arg1313 и Arg 1648). См. Pipe, S.W., et al., *J. Thromb. Haemost.* 9. 2235-2242 (2011). В

некоторых вариантах осуществления BDD FVIII включает в себя одноцепочечный FVIII, который содержит делецию аминокислот 765–1652, соответствующий зрелому полноразмерному FVIII (также известный как одноцепочечный rVIII и AFSTYLA®). См. патент США № 7041635. Каждая из вышеизложенных делеций может быть произведена в любой последовательности FVIII.

[00190] Известно множество функциональных вариантов FVIII, обсуждаемых выше и ниже. Кроме того, у пациентов с гемофилией были идентифицированы сотни нефункциональных мутаций в FVIII, и было определено, что эффект данных мутаций в отношении функции FVIII обусловлен в большей степени тем, где они расположены в 3-мерной структуре FVIII, а не природой замены (Cutler *et al.*, *Hum. Mutat.* 19:274–8 (2002), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кроме того, путем сравнения FVIII от людей и FVIII от других видов идентифицировали консервативные остатки, которые, вероятно, необходимы для функционирования (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317–22 (1998); US 6251632, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00191] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, является эквивалентным эффективному количеству FVIII без Fc-области. В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 10 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 190 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 180 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 170 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 160 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 150 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 140 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до

приблизительно 130 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 120 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 110 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 90 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 80 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 70 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до
 приблизительно 60 МЕ/кг, от приблизительно 25 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 25 МЕ/кг до
 приблизительно 90 МЕ/кг, от приблизительно 25 МЕ/кг до
 приблизительно 80 МЕ/кг, от приблизительно 25 МЕ/кг до
 приблизительно 70 МЕ/кг, от приблизительно 25 МЕ/кг до
 приблизительно 65 МЕ/кг. В одном конкретном варианте
 осуществления эффективное количество составляет от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг. В другом
 варианте осуществления эффективное количество составляет от
 приблизительно 25 МЕ/кг до приблизительно 65 МЕ/кг. В других
 вариантах осуществления эффективное количество составляет от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 30 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 40 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 60 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 70 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 80 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 90 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 90 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 80 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 70 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 60 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 50 МЕ/кг, от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 40 МЕ/кг или от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 30 МЕ/кг.

[00192] В некоторых вариантах осуществления эффективное
 количество составляет приблизительно 10 МЕ/кг, приблизительно 15
 МЕ/кг, приблизительно 20 МЕ/кг, приблизительно 25 МЕ/кг,

приблизительно 30 МЕ/кг, приблизительно 35 МЕ/кг, приблизительно 40 МЕ/кг, приблизительно 45 МЕ/кг, приблизительно 50 МЕ/кг, приблизительно 55 МЕ/кг, приблизительно 60 МЕ/кг, приблизительно 65 МЕ/кг, приблизительно 70 МЕ/кг, приблизительно 75 МЕ/кг, приблизительно 80 МЕ/кг, приблизительно 85 МЕ/кг, приблизительно 90 МЕ/кг, приблизительно 95 МЕ/кг, приблизительно 100 МЕ/кг, приблизительно 105 МЕ/кг, приблизительно 110 МЕ/кг, приблизительно 115 МЕ/кг, приблизительно 120 МЕ/кг, приблизительно 125 МЕ/кг, приблизительно 130 МЕ/кг, приблизительно 135 МЕ/кг, приблизительно 140 МЕ/кг, приблизительно 145 МЕ/кг, приблизительно 150 МЕ/кг, приблизительно 155 МЕ/кг, приблизительно 160 МЕ/кг, приблизительно 165 МЕ/кг, приблизительно 170 МЕ/кг, приблизительно 175 МЕ/кг, приблизительно 180 МЕ/кг, приблизительно 185 МЕ/кг, приблизительно 190 МЕ/кг, приблизительно 195 МЕ/кг, приблизительно 200 МЕ/кг, приблизительно 225 МЕ/кг, приблизительно 250 МЕ/кг, приблизительно 275 МЕ/кг или приблизительно 300 МЕ/кг. В одном конкретном варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 50 МЕ/кг. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 100 МЕ/кг. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 200 МЕ/кг.

[00193] Интервал между введениями доз при введении композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область или их фрагмент, может быть по меньшей мере в приблизительно полтора раза длиннее, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы указанного фактора свертывания крови без Fc-домена. Интервал между введениями доз может быть по меньшей мере приблизительно в полтора-шесть раз длиннее, полтора-пять раз длиннее, полтора-четыре раза длиннее, полтора-три раза длиннее или полтора-два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы указанного FVIII без Fc-домена.

[00194] В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-

область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 25 дней, приблизительно 26 дней, приблизительно 27 дней, приблизительно 28 дней, приблизительно 29 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 45 дней или приблизительно 60 дней.

[00195] В некоторых вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 3 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 4 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 5 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 6 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 8 до приблизительно 14 дней, от

приблизительно 9 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 11 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 12 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 13 до приблизительно 14 дней или от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней. В других вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 1 до приблизительно 20 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 19 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 18 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 17 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 16 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 3 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 4 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 6 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 7 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 8 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 9 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 10 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 11 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 12 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 13 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 14 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 15 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 16 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 17 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 18 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 19 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 20

до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 15 до приблизительно 20 дней. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 2 до приблизительно 6 дней. В других вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 3 до приблизительно 5 дней.

[00196] В одном варианте осуществления эффективная доза составляет 25–65 МЕ/кг (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, или 65 МЕ/кг), и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 3–5, 3–6, 3–7, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или больше дней, или три раза в неделю, или не более трех раз в неделю. В другом варианте осуществления эффективная доза составляет 65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в неделю или один раз в 6–7 дней. Дозы можно вводить повторно до тех пор, пока имеется необходимость в них (например, в течение по меньшей мере 10, 20, 28, 30, 40, 50, 52 или 57 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет). В одном конкретном варианте осуществления эффективная доза составляет приблизительно 25–65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 3–5 дней.

[00197] Композиция или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, могут быть составлены для любого подходящего способа введения, в том числе, например, местного (например, трансдермального или глазного), перорального, трансбуккального, назального, вагинального, ректального или парентерального введения.

[00198] Термин "парентеральный", используемый в данном документе, включает подкожную, внутрикожную, внутрисосудистую (например, внутривенную), внутримышечную, спинномозговую, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, периокулярную,

внутриорбитальную, интрасиновиальную и внутрибрюшинную инъекцию, а также любую подобную методику инъекции или инфузии. Композиция также может представлять собой, например, суспензию, эмульсию, состав с замедленным высвобождением, крем, гель или порошок. Композиция может быть составлена в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды.

[00199] В одном примере фармацевтический состав представляет собой жидкий состав, например, забуференный изотонический водный раствор. В другом примере фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, которое является физиологическим или близким к физиологическому. В других примерах водный состав характеризуется физиологическими или близкими к физиологическим значениями осмолярности и содержания солей. Он может содержать хлорид натрия и/или ацетат натрия.

[00200] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII и Fc-область, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, составлен в виде фармацевтической композиции, содержащей: (a) химерный полипептид; (b) один или несколько стабилизаторов, выбранных из сахарозы, трегалозы, рафинозы, аргинина или их смеси; (c) хлорид натрия (NaCl); (d) L-гистидин; (e) хлорид кальция и (f) полисорбат 20 или полисорбат 80. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) от 50 МЕ/мл до 2500 МЕ/мл химерного полипептида; (b) от 10 мг/мл до 25 мг/мл сахарозы; (c) от 8,8 мг/мл до 14,6 мг/мл хлорида натрия (NaCl); (d) от 0,75 мг/мл до 2,25 мг/мл L-гистидина; (e) от 0,75 мг/мл до 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция и (f) от 0,08 мг/мл до 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В некоторых примерах фармацевтическая композиция, применяемая в способах согласно настоящему изобретению, является лиофилизированной.

[00201] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит клетку.

II.A.2. Фактор IX

[00202] Фактор IX человека (FIX) представляет собой сериновую протеазу, которая является важным компонентом внутреннего пути каскада коагуляции крови. "Фактор IX" или "FIX", как используется в данном документе, относится к белковому фактору коагуляции и его разновидностям и вариантам последовательностей и включает в себя без ограничения одноцепочечную последовательность полипептида-предшественника FIX человека из 461 аминокислоты ("препро-форму"), одноцепочечную последовательность зрелого FIX человека из 415 аминокислот и вариант FIX R338L (Padua). FIX включает в себя любую форму молекулы FIX с типичными характеристиками фактора коагуляции крови FIX. Подразумевается, что "фактор IX" и "FIX", как используется в данном документе, охватывают полипептиды, которые содержат домены Gla (область, содержащую остатки γ -карбоксихлутаминовой кислоты), EGF1 и EGF2 (области, содержащие последовательности, гомологичные эпидермальному фактору роста человека), активационный пептид ("AP", образованный остатками R136-R180 зрелого FIX) и С-концевой протеазный домен ("Pro") или синонимы этих доменов, известные из уровня техники, или могут представлять собой усеченный фрагмент или вариант последовательности, сохраняющий по меньшей мере часть биологической активности нативного белка.

[00203] FIX или варианты последовательностей были клонированы, как описано в патентах США №№ 4770999 и 7700734, и кДНК, кодирующая фактор IX человека, была выделена, охарактеризована и клонирована в векторы экспрессии (см., например, Choo et al., Nature 299:178-180 (1982); Fair et al., Blood 64:194-204 (1984); и Kurachi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 79:6461-6464 (1982)). Один конкретный вариант FIX, вариант FIX R338L (Padua), охарактеризованный Simioni et al., 2009, содержит мутацию приобретения функции, которая коррелирует с почти 8-кратным увеличением активности варианта Padua по сравнению с нативным FIX. Варианты FIX также могут включать в себя любой полипептид FIX, имеющий одну или несколько консервативных аминокислотных замен, которые не влияют на активность FIX полипептида FIX.

[00204] В некоторых вариантах осуществления FIX включает в себя слитый белок на основе фактора коагуляции IX (рекомбинантного) и альбумина (также известный как rIX-FP и IDELVION®).

[00205] Полипептид FIX имеет размер 55 кДа и синтезируется в виде препрополипептидной цепи, состоящей из трех областей: сигнального пептида из 28 аминокислот (аминокислоты 1-28), пропептида из 18 аминокислот (аминокислоты 29-46), требуемого для гамма-карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, и зрелого фактора IX из 415 аминокислот. Пропептид представляет собой последовательность из 18 аминокислотных остатков, расположенную с N-концевой стороны от гамма-карбоксиглутаматного домена. Пропептид связывается с витамин K-зависимой гамма-карбоксилазой и затем отщепляется от полипептида-предшественника FIX под действием эндогенной протеазы, наиболее вероятно PACE (фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот), также известной как фурин или PCSK3. Без гамма-карбоксилирования домен Gla не способен связывать кальций, принимая правильную конформацию, необходимую для заякоривания белка на отрицательно заряженных фосфолипидных поверхностях, что тем самым делает фактор IX нефункциональным. Даже в случае, когда домен Gla является карбоксилированным, его надлежащее функционирование также зависит от отщепления пропептида, поскольку остающийся пропептид препятствует конформационным изменениям домена Gla, необходимым для оптимального связывания с кальцием и фосфолипидами. У людей образующийся в результате зрелый фактор IX секретруется клетками печени в кровоток в виде неактивного зимогена, одноцепочечного белка из 415 аминокислотных остатков, который содержит примерно 17% по весу углеводов (Schmidt, A. E., et al. (2003) Trends Cardiovasc Med, 13: 39).

[00206] Зрелый FIX состоит из нескольких доменов, которыми в конфигурации от N- к C-концу являются: домен Gla, домен EGF1, домен EGF2, домен, представляющий собой активационный пептид (AP), и протеазный (или каталитический) домен. Короткий линкер соединяет домен EGF2 с доменом AP. FIX содержит два

активационных пептида, образованных соответственно из R145–A146 и R180–V181. После активации одноцепочечный FIX становится 2-цепочечной молекулой, в которой две цепи соединены дисульфидной связью. Факторы свертывания крови можно сконструировать путем замещения их активационных пептидов, что в результате приводит к изменению специфичности активации. У млекопитающих зрелый FIX должен быть активирован активированным фактором XI с получением фактора IXa. Протеазный домен при активации FIX до FIXa обеспечивает каталитическую активность FIX. Активированный фактор VIII (FVIIIa) представляет собой специфический кофактор, необходимый для полного проявления активности FIXa.

[00207] В других вариантах осуществления полипептид FIX включает в себя аллельную форму Thr148 плазменного фактора IX и обладает структурными и функциональными характеристиками, сходными с характеристиками эндогенного фактора IX.

[00208] Известно большое количество функциональных вариантов FIX. В международной публикации № WO 02/040544 A3 на странице 4 в строках 9–30 и на странице 15 в строках 6–31 раскрыты мутантные формы, демонстрирующие увеличенную устойчивость к ингибированию гепарином. В международной публикации № WO 03/020764 A2 в таблицах 2 и 3 (на страницах 14–24) и на странице 12 в строках 1–27 раскрыты мутантные формы FIX с пониженной Т-клеточной иммуногенностью. В международной публикации № WO 2007/149406 A2 от страницы 4, строки 1 до страницы 19, строки 11 раскрыты функциональные мутантные молекулы FIX, демонстрирующие увеличенную стабильность белков, увеличенный период полужизни *in vivo* и *in vitro* и увеличенную устойчивость к протеазам. В WO 2007/149406 A2 от страницы 19, строки 12 до страницы 20, строки 9 также раскрыты химерные и другие вариантные молекулы FIX. В международной публикации № WO 08/118507 A2 от страницы 5, строки 14 до страницы 6, строки 5 раскрыты мутантные формы FIX, демонстрирующие увеличенную свертывающую активность. В международной публикации № WO 09/051717 A2 от страницы 9, строки 11 до страницы 20, строки 2 раскрыты мутантные формы FIX, имеющие увеличенное количество сайтов N-связанного и/или O-связанного гликозилирования, что

приводит к увеличению периода полужизни и/или степени обнаружения. В международной публикации № WO 09/137254 A2 от страницы 2, абзаца [006] до страницы 5, абзаца [011] и от страницы 16, абзаца [044] до страницы 24, абзаца [057] также раскрыты мутантные формы фактора IX с увеличенным количеством сайтов гликозилирования. В международной публикации № WO 09/130198 A2 от страницы 4, строки 26 до страницы 12, строки 6 раскрыты функциональные мутантные молекулы FIX, которые имеют увеличенное количество сайтов гликозилирования, что приводит к увеличению периода полужизни. В международной публикации № WO 09/140015 A2 от страницы 11, абзаца [0043] до страницы 13, абзаца [0053] раскрыты функциональные мутантные FIX, имеющие увеличенное количество остатков Cys, которые можно использовать для конъюгирования с полимером (например, PEG). Полипептиды FIX, описанные в международной заявке № PCT/US2011/043569, поданной 11 июля 2011 г. и опубликованной как WO 2012/006624 12 января 2012 г., также включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00209] В дополнение, у субъектов с гемофилией были идентифицированы сотни нефункциональных мутаций в FIX, многие из которых раскрыты в таблице 5 на страницах 11-14 международной публикации № WO 09/137254 A2. Такие нефункциональные мутации не включены в настоящее изобретение, но обеспечивают дополнительные указания в отношении того, какие мутации с большей или меньшей долей вероятности приводят к образованию функционального полипептида FIX.

[00210] Коагулянтная активность фактора IX выражается в международных единицах (МЕ). Одна МЕ активности FIX соответствует примерно количеству FIX в одном миллилитре нормальной плазмы крови человека. Доступны несколько анализов для измерения активности фактора IX, в том числе одностадийный анализ свертывания крови (активированное частичное тромбопластиновое время; aPTT), время образования тромбина (TGA) и ротационная тромбоэластометрия (ROTEM®). Настоящее изобретение охватывает последовательности, характеризующиеся гомологией с последовательностями FIX, фрагменты последовательностей, которые

являются природными, как, например, полученными от людей, приматов, отличных от человека, млекопитающих (в том числе домашних животных), и неприродные варианты последовательностей, которые сохраняют по меньшей мере часть биологической активности или биологической функции FIX и/или которые являются применимыми для предупреждения, лечения заболевания, дефицита, нарушения или состояния, связанного с фактором коагуляции (например, эпизодов кровотечения, связанных с травмой, хирургической операцией, при дефиците фактора коагуляции), опосредованного влияния на него или уменьшения интенсивности его проявлений. Последовательности, характеризующиеся гомологией с FIX, можно найти с помощью стандартных методик поиска гомологии, таких как BLAST от NCBI.

[00211] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка, содержащих FIX и Fc-область, является эквивалентным эффективному количеству FIX без Fc-области. В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 0,1 МЕ/кг до приблизительно 500 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 10 МЕ/кг до приблизительно 400 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 275 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 225 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 175 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 150 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 90 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 80 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 70 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 60 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 50 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 40 МЕ/кг, от приблизительно 20 МЕ/кг до

приблизительно 30 МЕ/кг, от приблизительно 30 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 40 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 50 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 60 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 70 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 80 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 90 МЕ/кг до
 приблизительно 100 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до
 приблизительно 200 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до
 приблизительно 200 МЕ/кг или от приблизительно 25 МЕ/кг до
 приблизительно 75 МЕ/кг. В одном конкретном варианте
 осуществления эффективное количество составляет от
 приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг.

[00212] В некоторых вариантах осуществления эффективное
 количество составляет приблизительно 10 МЕ/кг, приблизительно 15
 МЕ/кг, приблизительно 20 МЕ/кг, приблизительно 25 МЕ/кг,
 приблизительно 30 МЕ/кг, приблизительно 35 МЕ/кг, приблизительно
 40 МЕ/кг, приблизительно 45 МЕ/кг, приблизительно 50 МЕ/кг,
 приблизительно 55 МЕ/кг, приблизительно 60 МЕ/кг, приблизительно
 65 МЕ/кг, приблизительно 70 МЕ/кг, приблизительно 75 МЕ/кг,
 приблизительно 80 МЕ/кг, приблизительно 85 МЕ/кг, приблизительно
 90 МЕ/кг, приблизительно 95 МЕ/кг, приблизительно 100 МЕ/кг,
 приблизительно 105 МЕ/кг, приблизительно 110 МЕ/кг,
 приблизительно 115 МЕ/кг, приблизительно 120 МЕ/кг,
 приблизительно 125 МЕ/кг, приблизительно 130 МЕ/кг,
 приблизительно 135 МЕ/кг, приблизительно 140 МЕ/кг,
 приблизительно 145 МЕ/кг, приблизительно 150 МЕ/кг,
 приблизительно 155 МЕ/кг, приблизительно 160 МЕ/кг,
 приблизительно 165 МЕ/кг, приблизительно 170 МЕ/кг,
 приблизительно 175 МЕ/кг, приблизительно 180 МЕ/кг,
 приблизительно 185 МЕ/кг, приблизительно 190 МЕ/кг,
 приблизительно 195 МЕ/кг или приблизительно 200 МЕ/кг. В одном
 конкретном варианте осуществления эффективное количество
 составляет приблизительно 50 МЕ/кг. В другом варианте
 осуществления эффективное количество составляет приблизительно
 100 МЕ/кг.

[00213] Интервал между введениями доз при введении композиции или химерного белка, содержащих FIX и Fc-область или их фрагмент, может быть по меньшей мере в приблизительно полтора раза длиннее, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы указанного FIX без Fc-домена. Интервал между введениями доз может быть по меньшей мере приблизительно в полтора-шесть раз длиннее, полтора-пять раз длиннее, полтора-четыре раза длиннее, полтора-три раза длиннее или полтора-два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы указанного FIX без Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями доз является по меньшей мере приблизительно в полтора, два, два с половиной, три, три с половиной, четыре, четыре с половиной, пять, пять с половиной или шесть раз более длинным, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы указанного FIX без Fc-домена. Интервал между введениями доз может составлять приблизительно три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или больше. Интервал между введениями доз может составлять по меньшей мере от приблизительно полутора до 5, полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или больше. При лечении по необходимости интервал между введениями доз указанного химерного полипептида или гибридной молекулы составляет приблизительно 24-36, 24-48, 24-72, 24-96, 24-120, 24-144, 24-168, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, или 72 часа или больше.

[00214] В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FIX и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно

14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 25 дней, приблизительно 26 дней, приблизительно 27 дней, приблизительно 28 дней, приблизительно 29 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 45 дней или приблизительно 60 дней. В определенных вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней или приблизительно 14 дней. В одном конкретном варианте осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 2 дня (например, приблизительно 48 часов). В другом варианте осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 7 дней. В другом варианте осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 10 дней. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, соответствующим введению один раз в 6–10 часов. В определенных вариантах осуществления эффективную дозу композиции или химерного белка, содержащих FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, соответствующим введению один раз в день.

[00215] В некоторых вариантах осуществления композицию или

химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 1 до приблизительно 20 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 19 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 18 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 17 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 16 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 3 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 4 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 6 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 7 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 8 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 9 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 10 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 11 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 12 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 13 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 14 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 15 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 16 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 17 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 18 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 19 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 20 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 15 до приблизительно 20 дней.

[00216] В одном варианте осуществления эффективная доза представляет собой дозу, которая может поддерживать уровень 1-50

МЕ/дл циркулирующего FIX (например, по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, или 50 МЕ/дл). В другом варианте осуществления эффективная доза составляет 50 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в неделю. В другом варианте осуществления доза составляет 100 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 10 дней. Дозы можно вводить повторно до тех пор, пока имеется необходимость в них (например, в течение по меньшей мере 10, 20, 28, 30, 40, 50, 52 или 57 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет).

[00217] Композиция или химерный белок, содержащие FIX и Fc-область, могут быть составлены для любого подходящего способа введения, в том числе, например, местного (например, трансдермального или глазного), перорального, трансбуккального, назального, вагинального, ректального или парентерального введения.

[00218] Термин "парентеральный", используемый в данном документе, включает подкожную, внутрикожную, внутрисосудистую (например, внутривенную), внутримышечную, спинномозговую, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, периокулярную, внутриорбитальную, интрасиновиальную и внутрибрюшинную инъекцию, а также любую подобную методику инъекции или инфузии. Композиция также может представлять собой, например, суспензию, эмульсию, состав с замедленным высвобождением, крем, гель или порошок. Композиция может быть составлена в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды.

[00219] В одном примере фармацевтический состав представляет собой жидкий состав, например, забуференный изотонический водный раствор. В другом примере фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, которое является физиологическим или близким к физиологическому. В других примерах водный состав характеризуется физиологическими или

близкими к физиологическим значениями осмолярности и содержания солей. Он может содержать хлорид натрия и/или ацетат натрия.

[00220] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FIX и Fc-область, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, составлен в виде фармацевтической композиции, содержащей: (a) химерный полипептид; (b) смесь углеводов, содержащую сахарозу и маннит; (c) хлорид натрия (NaCl); (d) L-гистидин и (e) полисорбат 20 или полисорбат 80. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) от приблизительно 25 МЕ/мл до приблизительно 700 МЕ/мл полипептида фактора IX; (b) от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл сахарозы; (c) от приблизительно 20 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл маннита; (d) от приблизительно 3 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл NaCl; (e) от приблизительно 3 мг/мл до приблизительно 6 мг/мл L-гистидина; (f) от приблизительно 0,08 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80 или (g) любую их комбинацию. В некоторых примерах фармацевтическая композиция, применяемая в способах согласно настоящему изобретению, является лиофилизированной.

[00221] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит клетку.

II.A.3 Fc

[00222] Композиции или химерные белки согласно настоящему изобретению содержат Fc-домен или его часть, которые связываются с FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен слит с фактором свертывания крови, например, как часть химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область. В других вариантах осуществления Fc-домен слит с полипептидом, отличным от фактора свертывания крови, где композиция содержит (1) фактор свертывания крови и (2) химерный белок, содержащий Fc-домен и дополнительный полипептид. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен вводят совместно с фактором свертывания крови. Fc-домен или его часть

могут улучшать фармакокинетические или фармакодинамические свойства химерного белка. В определенных вариантах осуществления Fc-домен или его часть обеспечивают продление периода полужизни молекулы, слитой с Fc-доменом или его частью. В некоторых вариантах осуществления Fc-область химерного белка облегчает локализацию химерного белка в суставе.

[00223] Используемый в данном документе термин "Fc-домен" или "Fc-область" означает функциональную часть полипептида, которая соответствует Fc-домену нативного Ig, т. е. образованную путем димерной ассоциации соответствующих Fc-доменов двух его тяжелых цепей. Нативный Fc-домен образует гомодимер с другим Fc-доменом. В отличие от этого, термины "генетически слитая Fc-область" или "одноцепочечная Fc-область" (scFc-область), используемые в данном документе, относятся к синтетической димерной Fc-области, состоящей из Fc-доменов, генетически соединенных в одну полипептидную цепь (т. е. кодируемых одной непрерывной генетической последовательностью).

[00224] В одном варианте осуществления "Fc-область" относится к части одной тяжелой цепи Ig, начинающейся в шарнирной области непосредственно выше сайта расщепления папаином (т. е. остатка 216 в IgG, если принять первый остаток константной области тяжелой цепи за 114) и заканчивающейся на C-конце антитела. Соответственно, полный Fc-домен содержит по меньшей мере шарнирный домен, CH2-домен и CH3-домен.

[00225] Fc-область константной области Ig в зависимости от изоформа Ig может включать в себя домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие Fc-область Ig, наделяют химерный белок несколькими необходимыми свойствами, включая увеличенную стабильность, увеличенный период полужизни в сыворотке крови (см. Capon et al., 1989, Nature 337:525), а также связывание с Fc-рецепторами, такими как неонатальный Fc-рецептор (FcRn) (патенты США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00226] В некоторых вариантах осуществления Fc-область специфично связывается с FcRn. Рецептор FcRn был выделен у

некоторых видов млекопитающих, в том числе у людей. Последовательности FcRn человека, FcRn обезьяны, FcRn крысы и FcRn мыши являются известными (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). Рецептор FcRn связывает IgG (но не другие классы Ig, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низком значении pH, осуществляет активный транспорт IgG через клетку по направлению от просвета к серозной оболочке, а затем высвобождает IgG при относительно более высоком значении pH, обнаруживаемом в интерстициальных жидкостях. Он экспрессируется в эпителиальной ткани взрослых (патенты США № 6485726, 6030613, 6086875; WO 03/077834; US2003-0235536A1), в том числе в эпителии легких и кишечника (Israel et al. 1997, Immunology 92:69), эпителии почечных проксимальных канальцев (Kobayashi et al. 2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282: F358), а также эпителии полости носа, на поверхностях влагалища и поверхностях желчных протоков.

[00227] Fc-области, применимые в настоящем изобретении, охватывают молекулы, которые могут специфично связывать FcRn, FcγRIIB, и/или DC-SIGN, в том числе целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые включают в себя полную связывающую область для рецептора FcRn. Была описана область Fc-части IgG, которая связывается с FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN.

[00228] В одном конкретном варианте осуществления Fc-область специфично связывается с низкоаффинным рецептором для Fc-области иммуноглобулинов гамма II-b (FcγRIIB). FcγRIIB представляет собой ингибирующий Fc-рецептор, который контролирует аспекты воспалительной реакции. В частности, активация FcγRIIB ингибирует активирующие сигналы, приводящие к воспалению. Таким образом, активация FcγRIIB в сущности ингибирует воспаление.

[00229] В другом варианте осуществления Fc-область специфично связывается со специфичным для дендритных клеток неинтегрином, захватывающим молекулу межклеточной адгезии 3 типа (DC-SIGN). DC-SIGN, также известный как CD209, представляет собой лектиновый рецептор C-типа, экспрессируемый большинством клеток миелоидного происхождения, в том числе определенными

моноцитами, дендритными клетками и макрофагами. Исследования на мышах выявили, что активация DC-SIGN может ингибировать воспаление. См. Nimerjahn, Chapter 5, Molecular and Cellular Pathways Involved in the Anti-inflammatory Activity of IgG, Molecular Mechanisms of Antibody Activity, New York, NY 2013: 113-138.

[00230] "Специфично связанный" относится к двум молекулам, образующим комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфичное связывание характеризуется высокой аффинностью и емкостью от низкой до умеренной, в отличие от неспецифичного связывания, которое обычно характеризуется низкой аффинностью и емкостью от умеренной до высокой. Как правило, связывание считается специфичным, если константа аффинности KA превышает 10^6 M^{-1} или превышает 10^8 M^{-1} . При необходимости неспецифическое связывание может быть уменьшено без существенного влияния на специфическое связывание путем изменения условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, допустимое время связывания, концентрация блокирующего средства (например, сывороточного альбумина, казеина молока) и т. д., могут быть оптимизированы специалистом в данной области с применением обычных методик.

[00231] В определенных вариантах осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению содержит одну или несколько усеченных Fc-областей, которые, тем не менее, являются достаточными для придания Fc-области свойств связывания FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN. Например, часть Fc-области, которая связывается с FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN (т. е. FcRn-, FcγRIIB- и/или DC-SIGN-связывающая часть), содержит приблизительно аминокислоты 282-438 из IgG1 согласно нумерации EU, при этом основными сайтами контакта являются аминокислоты 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 из CH2-домена и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 из CH3-домена. Таким образом, Fc-область согласно настоящему изобретению может содержать FcRn-, FcγRIIB- и/или DC-SIGN-связывающую часть или состоять из нее. FcRn-, FcγRIIB- и/или DC-SIGN-связывающие части

могут быть получены из тяжелых цепей любого изотипа, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте осуществления применяют FcRn-, FcγRIIB- и/или DC-SIGN-связывающую часть из антитела изотипа IgG1 человека. В другом варианте осуществления применяют FcRn-, FcγRIIB- и/или DC-SIGN-связывающую часть из антитела изотипа IgG4 человека.

[00232] В другом варианте осуществления "Fc-область" включает в себя аминокислотную последовательность Fc-домена или аминокислотную последовательность, полученную из Fc-домена. В определенных вариантах осуществления Fc-область содержит по меньшей мере одно из шарнирного (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области) домена (приблизительно аминокислоты 216-230 Fc-области антитела в соответствии с нумерацией EU), CH2-домена (приблизительно аминокислоты 231-340 Fc-области антитела в соответствии с нумерацией EU), CH3-домена (приблизительно аминокислоты 341-438 Fc-области антитела в соответствии с нумерацией EU), CH4-домена или их варианта, части или фрагмента. В других вариантах осуществления Fc-область содержит полный Fc-домен (т. е. шарнирный домен, CH2-домен и CH3-домен). В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит шарнирный домен (или его часть), слитый с CH3-доменом (или его частью), шарнирный домен (или его часть), слитый с CH2-доменом (или его частью), CH2-домен (или его часть), слитый с CH3-доменом (или его частью), CH2-домен (или его часть), слитый как с шарнирным доменом (или его частью), так и с CH3-доменом (или его частью), состоит по сути из них или состоит из них. В еще нескольких вариантах осуществления Fc-область не содержит по меньшей мере части CH2-домена (например, всего или части CH2-домена). В конкретном варианте осуществления Fc-область содержит аминокислоты 221-447 в соответствии с нумерацией EU или состоит из них.

[00233] Fc-области, обозначенные в данном документе как F, F1 или F2, могут быть получены из ряда различных источников. В одном варианте осуществления Fc-область полипептида получена из Ig человека. Однако следует понимать, что Fc-область может быть получена из Ig другого вида млекопитающего, в том числе,

например, вида грызуна (например, мыши, крысы, кролика или морской свинки) или отличного от человека примата (например, шимпанзе, макака). Более того, полипептидные Fc-домены или их части могут быть получены из любого класса Ig, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа Ig, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В другом варианте осуществления применяют изотип IgG1 человека.

[00234] В определенных вариантах осуществления вариант Fc обеспечивает изменение по меньшей мере одной эффекторной функции, придаваемой Fc-областью, содержащей Fc-домен дикого типа (например, улучшение или снижение способности Fc-области связываться с Fc-рецепторами (например, снижение связывания с FcγRI или FcγRIII или улучшение связывания с FcRn или FcγRII), белками системы комплемента (например, C1q) или другими партнерами Fc по связыванию (например, улучшение связывания с DC-SIGN) или индуцировать антителозависимую цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или комплементзависимую цитотоксичность (CDCC)). В других вариантах осуществления вариант Fc предоставляет сконструированный цистеиновый остаток.

[00235] В качестве Fc-областей согласно настоящему изобретению могут использоваться известные из уровня техники варианты Fc, которые, как известно, обеспечивают изменение (например, усиление или снижение) эффекторной функции и/или связывания FcR. В частности, связывающая молекула согласно настоящему изобретению может содержать, например, изменение (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях, раскрытых в международных публикациях согласно РСТ WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 и WO06/085967A2; публикациях заявок на патент США №№ US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603,

US20070286859, US20080057056 или патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253; 7083784; 7404956 и 7317091, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления конкретное изменение (например, конкретная замена одной или нескольких аминокислот, раскрытых в уровне техники) может быть осуществлено в одном или нескольких раскрытых аминокислотных положениях. В другом варианте осуществления может быть осуществлено другое изменение в одном или нескольких раскрытых аминокислотных положениях (например, другая замена в одном или нескольких аминокислотных положениях, раскрытых в уровне техники).

[00236] Fc-область может быть модифицирована в соответствии с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и т. п., с получением модифицированных Fc-фрагментов или их частей, которые будут связываться с FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN. Такие модификации включают модификации, удаленные от сайтов контакта с FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN, а также модификации в пределах сайтов контакта, которые обеспечивают сохранение или даже усиление связывания с FcRn, FcγRIIB и/или DC-SIGN. Например, следующие отдельные аминокислотные остатки в Fc IgG1 человека (Fcγ1) могут быть заменены без значительной потери аффинности связывания Fc в отношении FcγRIIB и/или DC-SIGN: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, и K447A, где, например, P238A представляет пролин дикого типа, замененный аланином в положении под номером 238.

[00237] В качестве примера, конкретный вариант осуществления включает мутацию N297A, обеспечивающую удаление высококонсервативного сайта N-гликозилирования. Аминокислоты дикого типа в положениях, указанных выше, могут быть заменены, в дополнение к аланину, другими аминокислотами. Мутации могут быть введены в Fc по отдельности, что приводит к образованию более ста Fc-областей, отличных от нативного Fc. Кроме того, комбинации из двух, трех или более из этих отдельных мутаций могут быть введены вместе, что приводит к образованию сотен других Fc-областей. Более того, одна из Fc-областей конструкции согласно настоящему изобретению может быть подвергнута мутации, а другая Fc-область конструкции вообще не подвергнута мутации, или они обе могут быть подвергнуты мутации, но с помощью разных мутаций.

[00238] В одном варианте осуществления Fc-домен или его часть представляют собой полипептид, содержащий SEQ ID NO: 3 из патента США № 5739277, и необязательно дополнительно содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11, 1, 2 и 31 из патента США № 5739277.

[00239] В определенных вариантах осуществления Fc-домен или его часть являются полугликозилированными. Например, химерный белок, содержащий две Fc-области, может содержать первую гликозилированную Fc-область (например, гликозилированную CH2-область) и вторую негликозилированную Fc-область (например, негликозилированную CH2-область). В одном варианте осуществления линкер может быть помещен между гликозилированной и негликозилированной Fc-областями. В другом варианте осуществления Fc-область является полностью гликозилированной, т. е. все Fc-области являются гликозилированными. В других вариантах осуществления Fc-область может быть негликозилированной, т. е. ни один из Fc-компонентов не является гликозилированным.

[00240] В определенных вариантах осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную замену в Fc-домене или его части (например, варианты Fc), обеспечивающую изменение независимых от антигена эффекторных

функций Fc-домена, в частности периода полужизни белка в кровотоке.

[00241] Fc-область, применяемая в настоящем изобретении, также может содержать известную из уровня техники аминокислотную замену, обеспечивающую изменение гликозилирования химерного белка. Например, Fc-область химерного белка, соединенная с белком FVIII или белком FIX, может включать в себя Fc-область, имеющую мутацию, приводящую к пониженному гликозилированию (например, N- или O-связанному гликозилированию), или может включать в себя измененную гликоформу Fc-компонента дикого типа (например, гликан с низким содержанием фукозы или не содержащий фукозы гликан).

[00242] В одном варианте осуществления непротессированный химерный белок согласно настоящему изобретению может содержать генетически слитую Fc-область (т. е. scFc-область), имеющую две или более составляющих ее константных областей Ig или их частей, независимо выбранных из константной области Ig или ее части, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления Fc-области димерной Fc-области являются одинаковыми. В другом варианте осуществления по меньшей мере две Fc-области являются разными. Например, Fc-области белков согласно настоящему изобретению содержат одинаковое количество аминокислотных остатков, или они могут отличаться по длине одним или несколькими аминокислотными остатками (например, приблизительно 5 аминокислотными остатками (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными остатками), приблизительно 10 остатками, приблизительно 15 остатками, приблизительно 20 остатками, приблизительно 30 остатками, приблизительно 40 остатками или приблизительно 50 остатками). В еще нескольких других вариантах осуществления Fc-области белка согласно настоящему изобретению могут отличаться по последовательности в одном или нескольких аминокислотных положениях. Например, по меньшей мере две из Fc-областей могут отличаться по приблизительно 5 аминокислотным положениям (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотным положениям), приблизительно 10 положениям, приблизительно 15 положениям, приблизительно 20 положениям, приблизительно 30

положениям, приблизительно 40 положениям или приблизительно 50 положениям.

[00243] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит более одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит две полипептидных цепи. В определенных вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит фактор свертывания крови и первую Fc-область, а вторая полипептидная цепь содержит вторую Fc-область. В определенных вариантах осуществления первая Fc-область и вторая Fc-область связаны посредством ковалентной связи. В одном варианте осуществления первая Fc-область и вторая Fc-область связаны посредством пептидной связи. В другом варианте осуществления первая Fc-область и вторая Fc-область связаны посредством дисульфидной связи.

[00244] В одном конкретном варианте осуществления химерный белок содержит часть, представляющую собой фактор VIII, и часть, представляющую собой фактор фон Виллебранда (VWF), где часть FVIII включает в себя полипептид FVIII или его фрагмент, где часть VWF включает в себя полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом. В определенных вариантах осуществления часть VWF содержит домены D' и D3 из VWF. В одном варианте осуществления первый полипептид, второй полипептид или как первый полипептид, так и второй полипептид дополнительно содержат один или несколько компонентов, обеспечивающих продление периода полужизни.

[00245] Fc-область или ее часть для получения химерного белка, применяемого в способах согласно настоящему изобретению, могут быть получены из ряда различных источников. В некоторых вариантах осуществления Fc-область или ее часть получены из Ig человека. Однако следует понимать, что Fc-область или ее часть могут быть получены из Ig другого вида млекопитающего, в том числе, например, вида грызуна (например, мыши, крысы, кролика, морской свинки) или отличного от человека примата (например,

шимпанзе, макака). Более того, Fc-область или ее часть могут быть получены из любого класса Ig, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа Ig, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте осуществления применяют изотип IgG1 человека.

[00246] Разнообразные последовательности генов Fc-областей (например, последовательности генов Fc человека) доступны в форме общедоступных депонирований. Можно выбрать последовательности Fc, обладающие конкретной эффекторной функцией (или не обладающие конкретной эффекторной функцией) или имеющие конкретную модификацию для снижения иммуногенности. Было опубликовано большое количество последовательностей антител и генов, кодирующих антитела, и подходящие последовательности Fc-области могут быть получены из этих последовательностей с применением методик, известных из уровня техники. Генетический материал, полученный с применением любого из вышеуказанных способов, можно затем подвергать изменению или синтезу с получением химерных белков, применяемых в способах согласно настоящему изобретению. Дополнительно следует понимать, что объем настоящего изобретения охватывает аллели, варианты и мутации последовательностей ДНК константной области.

[00247] Последовательности Fc или ее части могут быть клонированы, например, с применением полимеразной цепной реакции и праймеров, выбранных для обеспечения амплификации представляющего интерес домена. Для клонирования последовательности Fc-области или ее части из антитела мРНК можно выделить из клеток гибридомы, селезенки или лимфатических клеток, подвергнуть обратной транскрипции с образованием ДНК и амплифицировать гены антитела с помощью ПЦР. Способы ПЦР-амплификации подробно описаны в патентах США №№ 4683195; 4683202; 4800159; 4965188 и, например, в "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270. ПЦР можно инициировать консенсусными праймерами для константной области или более специфичными праймерами на основе опубликованных

последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей. Как обсуждалось выше, ПЦР также можно применять для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае библиотеки могут быть подвергнуты скринингу с помощью консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды для константной области мыши. Из уровня техники известны многочисленные наборы праймеров, подходящие для амплификации генов антител (например, 5'-праймеры на основе N-концевой последовательности очищенных антител (Benhar and Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); праймеры для быстрой амплификации концов кДНК (Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); праймеры для лидерных последовательностей антител (Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250)). Клонирование последовательностей антител дополнительно описано в выданном Newman et al. патенте США № 5658570, заявка на который была подана 25 января 1995 г., который включен в данный документ посредством ссылки.

II.B. Компоненты, обеспечивающие продление периода полужизни

[00248] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит один или несколько компонентов, обеспечивающих продление периода полужизни. Период полужизни фактора свертывания крови можно определить с помощью любого способа, известного специалистам в данной области, например, с помощью анализов активности FVIII (хромогенного анализа или одностадийного анализа свертывания крови aPTT) с выявлением уровней активности FVIII в плазме крови или ELISA для FVIII/FIX с выявлением уровня антигена FVIII/FIX в плазме крови. В конкретном варианте осуществления период полужизни свертывающей активности фактора свертывания крови определяют с помощью одностадийного анализа свертывания крови. В более конкретном варианте осуществления период полужизни свертывающей активности фактора свертывания крови определяют у мышей – у мышей с HemA либо у мышей с двойным нокаутом (DKO) генов FVIII и фактора фон

Виллебранда.

[00249] В определенных аспектах гетерологичный компонент, который обеспечивает увеличение периода полужизни фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, включает без ограничения гетерологичный полипептид, такой как альбумин, Fc-область иммуноглобулина, последовательность XTEN, C-концевой пептид (СТР) β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин, компоненты, связывающие альбумин, или любые фрагменты, производные, варианты или комбинации этих полипептидов. В других связанных аспектах компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, может включать сайт присоединения компонента, не являющегося полипептидом, такого как полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), полисиаловая кислота или любые производные, варианты или комбинации этих компонентов. В определенных вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает в себя альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, не содержит XTEN. В других вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, содержит XTEN.

[00250] В других вариантах осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению конъюгирован с одним или несколькими полимерами. Полимер может быть растворимым в воде или нерастворимым в воде. Полимер может быть присоединен посредством ковалентной или нековалентной связи к фактору свертывания крови, Fc или к другим компонентам, конъюгированным с фактором свертывания крови либо с Fc. Неограничивающими примерами полимера могут быть поли(алкиленоксид), поли(винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиоксазолин или поли(акрилоилморфолин). Дополнительные типы, например, конъюгированного с полимером FVIII раскрыты в патенте США №

7199223, который включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[00251] В определенных аспектах химерный белок согласно настоящему изобретению может содержать один, два, три или больше компонентов, обеспечивающих продление периода полужизни, каждый из которых может представлять собой одну и ту же или разные молекулы.

[00252] В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, слит с N-концом или C-концом химерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, слит с N-концом или C-концом фактора свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, слит с N-концом или C-концом Fc. В определенных вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в фактор свертывания крови в составе химерного белка.

[00253] В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит FVIII или его часть, и компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в FVIII в одном или нескольких положениях, раскрытых в публикации заявки на патент США № 2015-0158929 A1 и/или международной публикации № WO2015106052 A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В одном конкретном варианте осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в домен В (или его фрагмент) FVIII. В одном конкретном варианте осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в FVIII непосредственно ниже аминокислотного остатка 745 зрелого FVIII.

[00254] В других вариантах осуществления химерный белок содержит FIX или его часть, и компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в FIX в одном или нескольких положениях, раскрытых в международной публикации № PCT/US16/045401. В одном конкретном варианте осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в FIX в сайте вставки непосредственно ниже аминокислотного

остатка, выбранного из группы, состоящей из аминокислоты 103, аминокислоты 105, аминокислоты 142, аминокислоты 149, аминокислоты 162, аминокислоты 166, аминокислоты 174, аминокислоты 224, аминокислоты 226, аминокислоты 228, аминокислоты 413 зрелого FIX Padua. В одном варианте осуществления химерный белок содержит FIX и Fc-область, где FIX содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставленный в домен FIX, представляющий собой активационный пептид (AP). В одном конкретном варианте осуществления химерный белок содержит FIX и Fc-область, где FIX содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставленный в FIX непосредственно ниже аминокислотного остатка 166 зрелого FIX Padua.

II.B.1. Альбумины

[00255] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полипептид альбумин или его фрагмент, вариант или производное. Сывороточный альбумин человека (HSA или HA), белок из 609 аминокислот в своей полноразмерной форме, ответственен за значительную долю осмотического давления сыворотки крови, а также выполняет функцию носителя эндогенных и экзогенных лигандов. Термин "альбумин", используемый в данном документе, включает полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог. Примеры альбумина или его фрагментов или вариантов раскрыты в публикациях заявок на патент США №№ 2008/0194481A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 или 2008/0153751 A1 или в публикациях заявок согласно РСТ №№ 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 или 2007/021494 A2, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00256] Полипептиды, связывающие альбумин (ABP), могут включать в себя без ограничения бактериальные домены, связывающие альбумин, пептиды, связывающие альбумин, или фрагменты антител, связывающие альбумин, которые могут связываться с альбумином. Домен 3 из стрептококкового белка G, раскрытого в Kraulis *et al.*, FEBS Lett. 378:190-194 (1996) и

Linhult *et al.*, *Protein Sci.* 11:206–213 (2002), является примером бактериального домена, связывающего альбумин. Примеры пептидов, связывающих альбумин, раскрыты в Dennis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 35035–35043 (2002). Примеры фрагментов антител, связывающих альбумин, раскрыты в Muller and Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:319–326 (2007); Roovers *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 56:303–317 (2007), и Holt *et al.*, *Prot. Eng. Design Sci.*, 21:283–288 (2008), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00257] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один сайт присоединения малой молекулы, не являющейся полипептидом, ее варианта или производного, которые могут связываться с альбумином. Например, химерный белок может содержать один или несколько органических компонентов, связывающих альбумин. Примером таких компонентов, связывающих альбумин, является 2-(3-малеимидопропанамидо)-6-(4-(4-йодфенил)бутанамидо)гексаноат (метка "Albu"), раскрытый в Trussel *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 20:2286–2292 (2009).

II.B.2. ХТЕН

[00258] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полипептид ХТЕН или его фрагмент, вариант или производное. Как используется в данном документе, "последовательность ХТЕН" относится к полипептидам увеличенной длины с не встречающимися в природе по сути неповторяющимися последовательностями, которые состоят в основном из небольших гидрофильных аминокислот, при этом последовательность характеризуется низкой степенью образования или отсутствием вторичной или третичной структуры при физиологических условиях. В качестве партнера для химерного белка ХТЕН могут служить в качестве носителя, придавая определенные необходимые фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства, например, при слиянии с фактором свертывания крови в составе химерного белка или вставке в него. Такие необходимые свойства включают без ограничения улучшенные фармакокинетические

параметры и характеристики растворимости.

[00259] Последовательность ХТЕН, слитая с фактором свертывания крови в составе химерного белка, применяемого в способах согласно настоящему изобретению, или вставленная в него, может придавать химерному белку одно или несколько из следующих преимущественных свойств: конформационную гибкость, повышенную растворимость в воде, высокую степень устойчивости к протеазам, низкую иммуногенность, слабое связывание с рецепторами млекопитающих или увеличенные значения гидродинамического радиуса (или радиуса Стокса). В определенных аспектах последовательность ХТЕН может обеспечивать увеличение фармакокинетических свойств, как, например, обеспечивать более длительный период полужизни (например, период полужизни *in vivo*) или увеличенную площадь под кривой (AUC), так что химерный белок сохраняется *in vivo* и обладает прокоагулянтной активностью в течение увеличенного периода времени по сравнению с химерным белком без ХТЕН.

[00260] Примеры последовательностей ХТЕН, которые могут быть вставлены в рекомбинантные белки FVIII согласно настоящему изобретению, раскрыты, например, в публикациях заявок на патент США №№ 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1 или публикациях международных патентных заявок №№ WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2 или WO 2015106052 A1, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

II.B.3. VWF или его фрагмент

[00261] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полипептид VWF или его фрагмент, вариант или производное. VWF (также известный как F8VWF) представляет собой крупный мультимерный гликопротеин, присутствующий в плазме крови и вырабатываемый конститутивно в эндотелии (в тельцах Вайбеля-Паладе), мегакариоцитах (α -гранулах тромбоцитов) и субэндотелиальной соединительной ткани. Основным мономером VWF

является белок из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит ряд специфических доменов с конкретной функцией – домен D'/D3 (который связывается с фактором VIII), домен A1 (который связывается с тромбоцитарным рецептором GPIb, гепарином и/или, возможно, коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с тромбоцитарным интегрином α IIb β 3, когда он активирован) и домен "цистеиновый узел" на С-конце белка (который является общим для VWF и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), трансформирующего фактора роста β (TGF β) и β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (β HCG)).

[00262] В одном варианте осуществления полипептид VWF представляет собой фрагмент VWF. Термин "фрагмент VWF", используемый в данном документе, включает без ограничения функциональные фрагменты VWF, содержащие домен D' и домен D3, которые способны ингибировать связывание эндогенного VWF с FVIII. В одном варианте осуществления химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит фактор свертывания крови, Fc-область и фрагмент VWF, где фактор свертывания крови включает в себя FVIII, и где фрагмент VWF связывается с белком FVIII. В другом варианте осуществления фрагмент VWF блокирует сайт связывания VWF на белке FVIII, тем самым ингибируя взаимодействие белка FVIII с эндогенным VWF. Фрагменты VWF включают в себя производные, варианты, мутанты или аналоги, у которых сохраняются эти виды активности VWF. В определенных вариантах осуществления фрагмент VWF содержит домен D' и домен D3 VWF.

[00263] Последовательность мономера из 2813 аминокислот VWF человека приведена в Genbank под номером доступа _NP_000543.2_. Нуклеотидная последовательность, кодирующая VWF человека, приведена в Genbank под номером доступа _NM_000552.3_.

[00264] В определенных вариантах осуществления белок VWF, применимый согласно данному документу, может быть дополнительно модифицирован для улучшения его взаимодействия с FVIII, например, для улучшения аффинности связывания с FVIII. В других вариантах осуществления белки VWF, применимые для настоящего

изобретения, могут иметь другие модификации, например, белок может быть пегилированным, гликозилированным, гезилированным или полисиалилированным. Иллюстративные последовательности VWF, применимые в способах согласно настоящему изобретению, представлены, например, в публикациях заявок на патент США №№ US 2015/0023959 A1, US 2015/0266943 A1 и US 2015/0158929. В определенных вариантах осуществления белок VWF или его фрагмент слит или совместно вводится с партнером по связыванию FcRn. В некоторых вариантах осуществления белок VWF или его фрагмент слит с Fc или совместно вводится с Fc или полипептидом, содержащим Fc. В некоторых вариантах осуществления белок VWF или его фрагмент слит с альбумином или совместно вводится с альбумином или полипептидом, содержащим альбумин.

II.B.4. CTR

[00265] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один C-концевой пептид (CTR) β -субъединицы хорионического гонадотропина человека или его фрагмент, вариант или производное. Известно, что CTR-пептиды обеспечивают увеличение периода полужизни данного белка. См., например, патент США № 5712122, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающие иллюстративные CTR-пептиды раскрыты в публикации заявки на патент США № US 2009/0087411 A1, включенной посредством ссылки.

II.B.5. PAS

[00266] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид PAS или его фрагмент, вариант или производное. Пептид PAS или последовательность PAS, как используется в данном документе, означают аминокислотную последовательность, содержащую в основном аланиновые и сериновые остатки или содержащую в основном аланиновые, сериновые и пролиновые остатки, при этом аминокислотная последовательность образует произвольную спиральную конформацию при физиологических условиях. Соответственно, последовательность PAS представляет собой структурный блок, полимер из аминокислот или

последовательность-кассету, которые содержат аланин, серин и пролин, состоят по сути из них или состоят из них, которые можно применять в качестве части гетерологического компонента в химерном белке. Полимер из аминокислот также может образовывать произвольную спиральную конформацию при добавлении в последовательность PAS остатков, отличных от аланина, серина и пролина, в качестве дополнительного компонента. Под "дополнительным компонентом" подразумевается, что аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть добавлены в последовательность PAS в определенной мере, например, не более приблизительно 12%, т. е. приблизительно 12 из 100 аминокислот последовательности PAS, не более приблизительно 10%, не более приблизительно 9%, не более приблизительно 8%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, т. е. приблизительно 2% или приблизительно 1% аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val. В физиологических условиях пептид PAS образует произвольную спиральную конформацию и за счет этого может обеспечивать увеличенную стабильность рекомбинантного белка согласно настоящему изобретению *in vivo* и/или *in vitro*, а также обладает прокоагулянтной активностью.

[00267] Неограничивающие примеры пептидов PAS раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2010/0292130 A1; публикации заявки согласно РСТ № WO 2008/155134 A1 и выданном европейском патенте № EP2173890.

II.B.6. НАР

[00268] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид, являющийся гомополимером из аминокислот (НАР), или его фрагмент, вариант или производное. Пептид НАР может содержать последовательность из повторяющихся глициновых остатков, которая имеет длину по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, 120 аминокислот, 140 аминокислот, 160 аминокислот, 180 аминокислот, 200 аминокислот, 250

аминокислот, 300 аминокислот, 350 аминокислот, 400 аминокислот, 450 аминокислот или 500 аминокислот. Последовательность НАР может обеспечивать увеличение периода полужизни компонента, слитого или связанного с последовательностью НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают без ограничения $(\text{Gly})_n$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ или $S(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20. В одном варианте осуществления n равняется 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или 40. В другом варианте осуществления n равняется 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, или 200. См., например, Schlapschy M *et al.*, *Protein Eng. Design Selection*, 20: 273–284 (2007).

II.B.7. Трансферрин

[00269] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид трансферрин или его фрагмент, вариант или производное. Любой трансферрин можно сливать с химерным белком, применяемым в способах согласно настоящему изобретению. В качестве примера, Tf человека дикого типа (Tf) представляет собой белок из 679 аминокислот размером приблизительно 75 кДа (без учета гликозилирования) с двумя основными доменами N (приблизительно 330 аминокислот) и C (приблизительно 340 аминокислот), которые, по-видимому, образуются в результате дубликации гена. См. номера доступа в GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 и S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00270] Трансферрин транспортирует железо посредством эндоцитоза, опосредованного рецепторами трансферрина (TfR). После высвобождения железа в эндосомальный компартмент и рециркуляции комплекса Tf-TfR на клеточную поверхность Tf высвобождается обратно во внеклеточное пространство для следующего цикла транспорта железа. Tf обладает длительным периодом полужизни, превышающим 14–17 дней (Li *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206–209 (2002)). Слитые белки, содержащие

трансферрин, исследовали в отношении увеличения периода полужизни, целенаправленной доставки противораковых терапевтических средств, доставки при пероральном введении и устойчивой активации проинсулина (Brandsma *et al.*, *Biotechnol. Adv.*, 29: 230–238 (2011); Bai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292–7296 (2005); Kim *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682–692 (2010); Wang *et al.*, *J. Controlled Release* 155:386–392 (2011)).

II.B.8. PEG

[00271] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один сайт присоединения гетерологичного компонента, не являющегося полипептидом, или его фрагмента, варианта или производного. Например, химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, может содержать один или несколько компонентов, представляющих собой полиэтиленгликоль (PEG), присоединенных к одному или нескольким аминокислотным остаткам в факторе свертывания крови и/или Fc-области.

[00272] Пегилирование белка может относиться к конъюгату, образуемому между белком и по меньшей мере одной молекулой полиэтиленгликоля (PEG). PEG коммерчески доступен в широком ассортименте с различными значениями молекулярной массы и диапазонами средней молекулярной массы. Типичные примеры диапазонов средней молекулярной массы PEG включают без ограничения приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400, приблизительно 600, приблизительно 1000, приблизительно 1300–1600, приблизительно 1450, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 3000–3750, приблизительно 3350, приблизительно 3000–7000, приблизительно 3500–4500, приблизительно 5000–7000, приблизительно 7000–9000, приблизительно 8000, приблизительно 10000, приблизительно 8500–11500, приблизительно 16000–24000, приблизительно 35000, приблизительно 40000, приблизительно 60000 и приблизительно 80000 дальтонов. Эти значения средней молекулярной массы приведены исключительно в качестве примеров, а не для ограничения каким-либо образом.

[00273] Химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, может быть пегилирован со включением одного или нескольких (например, 2-4) PEG-компонентов. Пегилирование можно проводить с помощью любой из реакций пегилирования, известных из уровня техники. Способы получения продукта на основе пегилированного белка обычно будут включать (i) осуществление реакции полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG) в условиях, при которых происходит присоединение пептида согласно настоящему изобретению к одной или нескольким группам PEG; и (ii) получение продукта(продуктов) реакции. В целом, оптимальные реакционные условия для реакций будут определяться в каждом конкретном случае на основании известных параметров и необходимого результата.

[00274] Существует ряд способов присоединения PEG, которые доступны специалистам в данной области, например, в Malik F *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992); публикациях заявок на европейский патент №№ EP0401384, EP0154316 и EP0401384 и публикациях международных патентных заявок №№ WO92/16221 и WO95/34326. В качестве неограничивающего примера, варианты FVIII могут содержать замены на цистеин, и цистеиновые остатки могут быть дополнительно конъюгированы с полимером PEG. См. Mei *et al.*, *Blood* 116:270-279 (2010) и патент США № 7632921, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

II.B.9. HES

[00275] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полимер гидроксиптилкрахмал (HES). HES является производным встречающегося в природе амилопектина и расщепляется альфа-амилазой в организме. HES проявляет преимущественные биологические свойства и применяется в качестве средства, восполняющего объем крови, и в гемодилюционной терапии в клиниках. См., например, Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987); и Weidler *et al.*,

Arzneim.-Forschung/Drug Res. 41: 494-498 (1991).

[00276] HES в основном характеризуют по молекулярно-массовому распределению и степени замещения. HES характеризуется средней молекулярной массой (средневзвешенной) от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа или от 4 до 70 кДа. Гидроксиэтилкрахмал может дополнительно характеризоваться степенью молярного замещения от 0,1 до 3, от 0,1 до 2, от 0,1 до 0,9 или от 0,1 до 0,8 и соотношением между замещением C2:C6 в диапазоне от 2 до 20 применительно к гидроксиэтильным группам. HES со средней молекулярной массой приблизительно 130 кДа представляет собой VOLUVEN® от Fresenius. VOLUVEN® представляет собой искусственный коллоид, применяемый, например, для восполнения объема, который применяют при терапевтическом показании для терапии и профилактики гиповолемии. Существует ряд способов присоединения HES, доступных специалистам в данной области, например, аналогичные способам присоединения PEG, которые описаны выше.

II.B.10. PSA

[00277] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полимер полисиаловую кислоту (PSA) PSA представляют собой встречающиеся в природе неразветвленные полимеры сиаловой кислоты, вырабатываемые определенными штаммами бактерий и у млекопитающих в определенных клетках. См., например, Roth J. et al. (1993) в *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds. Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (BirkhäuserVerlag, Basel, Switzerland), с. 335-348. PSA могут быть получены с различной степенью полимеризации от $n \approx 80$ или больше остатков сиаловой кислоты до $n=2$ путем неполного кислотного гидролиза, или путем расщепления нейраминидазами, или путем фракционирования природных полученных из бактерий форм полимера. Существует ряд способов присоединения PSA, доступных специалистам в данной области, например, аналогичные способам присоединения PEG, которые описаны выше. В определенных аспектах активированная PSA также может быть присоединена к аминокислотному остатку цистеину в факторе свертывания крови,

например, в FVIII или FIX, или в Fc-области. См., например, патент США № 5846951.

II.B.11. Рецепторы, опосредующие выведение

[00278] В определенных аспектах период полужизни химерного белка, применяемого в способах согласно настоящему изобретению, может быть увеличен, если фактор свертывания крови в составе химерного белка содержит FVIII и по меньшей мере один фрагмент рецептора, опосредующего выведение FVIII, или его FVIII-связывающий фрагмент, вариант или производное. Посредством вставки растворимых форм рецепторов, опосредующих выведение, таких как белок LRP1, родственный рецепторам липопротеинов низкой плотности, или их фрагментов можно блокировать связывание FVIII с рецепторами, опосредующими выведение, и за счет этого продлевать его период полужизни, например, период полужизни *in vivo*. LRP1 представляет собой интегральный мембранный белок размером 600 кДа, который участвует в рецептор-опосредованном выведении различных белков, в том числе FVIII. См., например, Lenting *et al.*, Haemophilia 16:6-16 (2010). Другими подходящими рецепторами, опосредующими выведение FVIII, являются, например, LDLR (рецептор липопротеинов низкой плотности), VLDLR (рецептор липопротеинов очень низкой плотности) и мегалин (LRP-2) или их фрагменты. См., например, Bovenschen *et al.*, Blood 106:906-912 (2005); Bovenschen, Blood 116:5439-5440 (2010); Martinelli *et al.*, Blood 116:5688-5697 (2010).

III. Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[00279] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения обратимой гемофилической артропатии сустава у человека, имеющего гемофилию, включающий введение человеку эффективного количества полинуклеотида или ряда полинуклеотидов, кодирующих фактор свертывания крови и/или Fc-область, например, кодирующих химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или ряд полинуклеотидов находятся в векторе экспрессии или ряде векторов экспрессии. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии или ряд векторов экспрессии находится в одной или нескольких клетках-хозяевах.

[00280] Полинуклеотид, кодирующий фактор свертывания крови и/или Fc-область, например, кодирующий химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, может представлять собой одну нуклеотидную последовательность, две нуклеотидные последовательности, три нуклеотидные последовательности или больше. В одном варианте осуществления одна нуклеотидная последовательность кодирует химерный белок, содержащий фактор свертывания крови (например, полипептид FVIII или FIX) и Fc-область. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит две нуклеотидные последовательности, при этом первая нуклеотидная последовательность кодирует фактор свертывания крови (например, FVIII), а вторая нуклеотидная последовательность кодирует Fc-область. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит две нуклеотидные последовательности, при этом первая нуклеотидная последовательность кодирует фактор свертывания крови (например, FVIII или FIX) и Fc-область, а вторая нуклеотидная последовательность кодирует вторую Fc-область. В определенных вариантах осуществления кодируемые Fc-домены образуют ковалентную связь после экспрессии.

[00281] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кодон-оптимизированным.

[00282] Как используется в данном документе, вектор экспрессии относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае с вектором на основе РНК-содержащего вируса, необходимые элементы для репликации и трансляции при введении в соответствующую клетку-хозяина. Векторы экспрессии могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

[00283] Последовательность, контролирующая экспрессию гена, как используется в данном документе, представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность или комбинация промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции

кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Последовательность, контролирующая экспрессию гена, может, например, представлять собой промотор млекопитающего или вируса, такой как конститутивный или индуцибельный промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают без ограничения промоторы следующих генов: гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, промотор гена бета-актина и другие конститутивные промоторы. Иллюстративные вирусные промоторы, которые функционируют конститутивно в эукариотических клетках, включают в себя, например, промоторы из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян (например, SV40), вируса папилломы, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, а также промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Специалистам в данной области известны другие конститутивные промоторы. Промоторы, применимые в качестве последовательностей, контролирующей экспрессию генов, согласно настоящему изобретению, также включают в себя индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего средства. Например, промотор гена металлотioneина индуцируется с обеспечением транскрипции и трансляции в присутствии определенных ионов металлов. Другие индуцибельные промоторы известны специалистам в данной области.

[00284] Для целей настоящего изобретения можно применять многочисленные векторные системы экспрессии. Эти векторы экспрессии, как правило, способны реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде составной части хромосомной ДНК хозяина. Векторы экспрессии могут содержать последовательности, контролирующие экспрессию, в том числе без ограничения промоторы (например, промоторы, связанные с природным окружением, или гетерологичные промоторы), энхансеры, сигнальные последовательности, сигналы для сплайсинга, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Последовательности, контролирующие экспрессию, предпочтительно представляют собой эукариотические промоторные

системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. В векторах экспрессии также могут использоваться элементы ДНК, которые получены из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV), цитомегаловирус (CMV) или вирус SV40. В других предусматривается применение полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом.

[00285] Обычно векторы экспрессии содержат селективируемые маркеры (например, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к тетрациклину или ген устойчивости к неомицину) для обеспечения выявления тех клеток, которые трансформированы необходимыми последовательностями ДНК (см., например, Itakura *et al.*, патент США № 4704362). Клетки, в хромосомы которых интегрировались ДНК, могут быть отобраны путем введения одного или нескольких маркеров, которые обеспечивают возможность отбора трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофность ауксотрофного хозяина, устойчивость к биоцидам (например, к антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Селективируемый маркерный ген может быть непосредственно связан с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку путем котрансформации.

[00286] Примером вектора, примененного для оптимизированной экспрессии химерных белков, применяемых в способах согласно настоящему изобретению, является NEOSPLA (патент США № 6159730). Этот вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, главный промотор бета-глобина мыши, точку начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 гена неомицинофосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Было обнаружено, что этот вектор обеспечивает очень высокий уровень экспрессии антител при включении генов варибельной и константной областей, трансфекции в клетках с последующим отбором в содержащей G418 среде и амплификацией под действием метотрексата. Векторные системы также описаны в патентах США №№

5736137 и 5658570, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Эта система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например, > 30 пг/клетка/день. Другие иллюстративные векторные системы раскрыты, например, в патенте США № 6413777.

[00287] В других вариантах осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению экспрессируются с применением полицистронных конструкций. В этих системах экспрессии множество представляющих интерес продуктов генов, как, например, множество полипептидов мультимерного связывающего белка, может быть получено из одной полицистронной конструкции. В этих системах преимущественно используют сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, который также включен в данный документ.

[00288] В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующих полипептид, вектор экспрессии можно вводить в соответствующую клетку-хозяина. Иными словами, клетки-хозяева можно подвергать трансформации. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществлять с помощью различных методик, хорошо известных специалистам в данной области, как обсуждалось выше. Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для выработки химерного белка, и анализируют в отношении синтеза химерного белка. Иллюстративные методики анализа включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) или анализ с применением клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимический анализ и т. п.

[00289] Подробное описание настоящего изобретения станет более понятным при обращении к следующим примерам, которые включены в него исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1

Долгосрочная эффективность профилактики с использованием rFVIIIIFc у субъектов-детей, подростков и взрослых, имеющих

суставы-мишени и тяжелую гемофилию А

[00290] У людей с гемофилией частое кровотечение в один и тот же сустав (сустав-мишень) может способствовать развитию гемофилической артропатии (хронического заболевания суставов). rFVIIIFc был разработан для продления периода полужизни фактора VIII (FVIII) по сравнению с традиционными препаратами FVIII (Peters et al., *J. Thromb. Haemost.* 11(1):132-41 (2013)). В завершенных исследованиях, представляющих собой опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 (идентификатор на ClinicalTrials.gov: NCT01181128; Mahlangu, et al., *Blood* 123(3):317-25 (2014)) и опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей (NCT01458106; Young et al., *J. Thromb. Haemost.* 13(6):967-77 (2015)), была установлена безопасность и эффективность rFVIIIFc соответственно среди взрослых/подростков (пациентов в возрасте 12 лет или старше) и детей (пациентов в возрасте менее 12 лет) с тяжелой гемофилией А. Долгосрочную безопасность и эффективность rFVIIIFc оценивают в продолжающемся расширенном исследовании rFVIIIFc (NCT01454739; Nolan et al., *Haemophilia* 22(1):72-80(2016)).

[00291] Целью данного исследования является представление накопленных данных о длительной эффективности rFVIIIFc и QoL у субъектов, имеющих суставы-мишени на момент включения в опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 и опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей, по состоянию на дату прекращения сбора данных промежуточного анализа в рамках второго расширенного исследования rFVIIIFc (8 декабря 2014 г.).

Способы

[00292] Оценивали субъектов, имеющих ≥ 1 сустав-мишень (крупный сустав с ≥ 3 эпизодами кровотечения в течение периода 6 месяцев (см. World Federation of Hemophilia, Guidelines for the Management of Hemophilia 2nd ed., Blackwell Publishing: Montréal, Canada (2012))) на момент включения в первоначальное исследование (т. е. опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 или опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей), для которых были доступны данные до исследования (т. е. до первоначального исследования) и данные в период исследования (по

конкретным суставам-мишеням и в целом). В расширенном исследовании rFVIIIFc представлены 4 группы лечения (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. Режимы лечения в рамках расширенного исследования rFVIIIFc

Режим лечения	Указания по введению доз согласно протоколу
Индивидуализированная профилактика	25–65 МЕ/кг rFVIIIFc каждые 3–5 дней ИЛИ rFVIIIFc дважды в неделю (20–65 МЕ/кг в день 1, 40–65 МЕ/кг в день 4); для субъектов-детей допускается корректировка дозы и частоты (каждые 2–5 дней)
Еженедельная профилактика	65 МЕ/кг rFVIIIFc каждые 7 дней
Модифицированная профилактика	Исследователи могут регулировать введение доз с учетом персональных предпочтений у субъектов, у которых не может быть достигнута оптимальная профилактика при индивидуализированной или еженедельной профилактике
Эпизодическое лечение	Введение доз rFVIIIFc с учетом типа и степени тяжести эпизода кровотечения

Субъекты в возрасте ≥ 12 лет могут участвовать в расширенном исследовании rFVIIIFc в рамках любого режима лечения, тогда как субъекты в возрасте < 12 лет могут участвовать только в рамках режимов лечения, предусматривающих индивидуализированную профилактику и модифицированную профилактику.

[00293] Исходы для субъектов, имеющих суставы-мишени, анализировали в апостериорном режиме в течение совокупной продолжительности первоначального исследования до даты прекращения сбора данных промежуточного анализа в рамках второго расширенного исследования rFVIIIFc. Исходы включали ABR, количество эпизодов кровотечения в суставах-мишенях и их восстановление, а также профилактическую дозу и частоту введения доз. Анализ восстановления суставов-мишеней выполняли для субъектов, проходивших период последующего наблюдения продолжительностью ≥ 12 последовательных месяцев и не подвергавшихся обширной хирургической операции (т. е. замене или удалению) на суставе-мишени после начала периода последующего

наблюдения. Сустав-мишень считался клинически восстановившимся, если в суставе-мишени наблюдалось ≤ 2 эпизодов спонтанного кровотечения в течение периода 12 последовательных месяцев (Blanchette et al., *J Thromb Haemost.* 12(11):1935–39 (2014)).

[00294] Количественные показатели QoL оценивали с помощью индекса Haem-A-QoL у субъектов, проходящих профилактику, которые имели возраст ≥ 17 лет, имели ≥ 1 восстановившийся сустав-мишень в течение исследования и имели оценки Haem-A-QoL как на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3, так и в год 2 расширенного исследования rFVIIIFc. У субъектов из опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей QoL измеряли с помощью инструмента оценки качества жизни детей Канадского справочника исходов при гемофилии (CHO-KLAT).

Результаты

Исследуемая популяция

[00295] Из 113 субъектов из опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3, которые имели суставы-мишени на исходном уровне, 111 субъектов на профилактическом или эпизодическом режиме до исследования и с данными в период исследования имели 287 суставов-мишеней на исходном уровне (медианный возраст 31,0 года; межквартильный размах (IQR) 24,0–44,0 года; таблица 2). Тринадцать субъектов из опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей имели 15 суставов-мишеней на исходном уровне и имели данные до исследования и в период исследования (медианный возраст 6,0 года; IQR 5,0–8,0 года; таблица 2).

ТАБЛИЦА 2. Демографические данные и характеристики исходного уровня^a

Характеристика	Первоначальное исследование	
	Опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3, n=111	Опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей, n=13
Медианный (IQR) возраст, годы	31,0 (24,0–44,0)	6,0 (5,0–8,0)
Режим до исследования		
Эпизодический	65 (58,6)	3 (23,1)

Профилактический	46 (41,4)	10 (76,9)
Общее количество суставов-мишеней, n	287	15
Количество суставов-мишеней, n (%) ^b		
1	42 (37,8)	11 (84,6)
2	27 (24,3)	2 (15,4)
3	7 (6,3)	0
>3	35 (31,5) ^c	0
Местоположение сустава-мишени, n (%)		
Локтевой сустав	69 (62,2)	4 (30,8)
Голеностопный сустав	65 (58,6)	9 (69,2)
Коленный сустав	48 (43,2)	1 (7,7)
Плечевой сустав	14 (12,6)	0
Лучезапястный сустав	6 (5,4)	0
Тазобедренный сустав	5 (4,5)	0

IQR – межквартильный размах. ^a Включены субъекты, имеющие ≥ 1 сустав-мишень на момент включения в первоначальное исследование и прошедшие период оценки эффективности. Сустав-мишень определяется как крупный сустав (например, локтевой сустав, голеностопный сустав, коленный сустав, плечевой сустав, лучезапястный сустав и тазобедренный сустав), в котором происходят повторные кровотечения (с частотой ≥ 3 эпизодов кровотечения в один и тот же сустав в течение периода 6 последовательных месяцев). ^b Процентные доли в совокупности могут не составлять 100,0% вследствие округления. ^c Средний возраст субъектов составлял 39,9 года.

Показатели частоты кровотечений

[00296] Медианные (IQR) совокупные ABR в период исследования с профилактикой с использованием rFVIIIFc были более низкими, чем показатели частоты кровотечений с профилактикой до исследования, у взрослых/подростков и детей в возрасте 12 лет или младше (фиг. 1A-1D). Данные опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей дополнительно стратифицировали по возрасту пациентов, и медианные ABR до исследования и в период исследования показаны на фиг. 1E и 1F. До исследования пациенты в возрасте менее 6 лет имели более низкую медианную (IQR) ABR, чем пациенты в возрасте от 6 до < 12 лет (фиг. 1E). В период исследования пациенты в возрасте менее 6 лет имели более высокую совокупную ABR в период исследования,

совокупную ABR для суставов-мишеней и ABR для спонтанных кровотечений в суставах-мишенях, чем пациенты в возрасте от 6 до < 12 лет (фиг. 1F).

[00297] В опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 у 46,3% субъектов, проходивших индивидуализированную профилактику, 40,7% субъектов, проходивших еженедельную профилактику, и 21,4% субъектов, проходивших модифицированную профилактику, не было эпизодов кровотечения в суставах-мишенях, тогда как в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 у детей у 53,8% субъектов, проходивших индивидуализированную профилактику, не было эпизодов кровотечения в суставах-мишенях.

Клиническое восстановление суставов-мишеней

[00298] Среди субъектов, проходивших профилактику, которые имели суставы-мишени на исходном уровне и в течение 12 месяцев периода последующего наблюдения, у 100% (93/93) субъектов в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 и 100% (7/7) субъектов в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 у детей восстановился ≥ 1 сустав-мишень (т. е. наблюдалось ≤ 2 эпизодов спонтанного кровотечения в течение 12 последовательных месяцев); и у субъектов восстановились 98,3% (231/235) и 100% (9/9) суставов-мишеней (с учетом всех кровотечений) соответственно в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 и опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 у детей.

Профилактическое потребление фактора свертывания крови

[00299] Медианное (IQR) еженедельное профилактическое потребление фактора свертывания крови в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 (n=105) и опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 (n=13) у детей среди субъектов, проходивших профилактику, имевших суставы-мишени на исходном уровне, составляло соответственно 76,0 (68,0–90,9) МЕ/кг и 83,5 (79,9–111,6) МЕ/кг.

[00300] Потребление было сходным с наблюдавшимся у субъектов в первоначальных исследованиях, которые проходили профилактику как до опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3/опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей, так и в течение опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы

3/опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей и расширенного исследования rFVIIIFc и для которых были доступны данные о введении доз до исследования и в период исследования (опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3, n=79, 75,0 [70,0–113,8] МЕ/кг; опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей, n=54, 95,0 [75,0–113,0] МЕ/кг).

[00301] В обеих популяциях пациентов медианные (IQR) интервалы между введениями доз также были сходными между субъектами, проходившими профилактику, имевшими суставы-мишени на исходном уровне (опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3, n=105, 3,8 [3,5–5,6] дня; опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей, n=13, 3,5 [3,5–3,5] дня), и субъектами, проходившими профилактику, в первоначальном исследовании, для которых были доступны данные о введении доз до исследования и в период исследования (опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3, n=79, 3,5 [3,0–5,0] дней; опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 у детей, n=54, 3,5 [3,5–3,5] дня).

[00302] Данные опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей дополнительно стратифицировали по возрасту пациентов. Среднее еженедельное потребление у пациентов в возрасте менее 6 лет составляло 89,6 (75,3–97,5; n=6) МЕ/кг с интервалом между введениями доз 3,5 (3,5–3,5) дня. Для пациентов в возрасте от 6 до менее 12 лет среднее еженедельное потребление составляло 82,2 (79,4–113,2) МЕ/кг с интервалом между введениями доз 3,5 (3,0–3,6) дня.

Качество жизни

[00303] QoL в год 2 расширенного исследования rFVIIIFc у взрослых/подростков (n=48) улучшалось на 18% по сравнению с исходным уровнем в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 (таблица 3). У субъектов из опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей, имевших самосообщенные оценки CHO-KLAT на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 у детей и в год 1 расширенного исследования rFVIIIFc (n=6), средняя (с учетом среднеквадратического отклонения [SD]) оценка исходного уровня составляла 85,5 (12,1); в год 1 расширенного исследования rFVIIIFc оценки CHO-KLAT улучшались на 28% (среднее

[с учетом SD] улучшение составляло 24,1 [15,3]).

ТАБЛИЦА 3. Анализ Наем-A-QOL у субъектов, имевших суставы-мишени на исходном уровне

	Средняя (SD) оценка ^a на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 N=30-48 ^c	Средняя (SD) оценка ^a в месяц 24 расширенного исследования rFVIIIFc N=30-48 ^c	Среднее (SD) изменение	P-значение ^b
В целом	30,3 (15,7)	24,9 (15,7)	-5,4 (10,8)	0,001
Занятия спортом и досуг	51,5 (26,9)	40,8 (27,6)	-10,7 (21,7)	0,008
Физическое здоровье	42,7 (21,7)	32,1 (27,8)	-10,6 (19,8)	0,0005
Решение вопросов, связанных с гемофилией	17,0 (13,6)	15,3 (15,9)	-1,7 (17,5)	NS
Планирование семьи	15,5 (19,8)	11,5 (18,3)	-4,0 (16,3)	NS
Ощущения (в отношении гемофилии)	23,0 (21,8)	15,4 (19,2)	-7,7 (16,0)	0,002
Планы на будущее	38,9 (20,9)	33,8 (23,1)	-5,1 (15,4)	0,03
Партнерские отношения и половая сфера	12,6 (20,2)	12,2 (21,4)	-0,4 (20,6)	NS
Лечение	28,3 (16,6)	23,3 (14,1)	-5,0 (15,7)	0,03
Взгляды (на себя)	34,2 (22,7)	32,1 (21,1)	-2,1 (16,8)	NS
Работа и учеба в школе	19,6 (20,0)	13,7 (19,1)	-6,0 (12,1)	0,002

NS – незначимо

^a Оценки Наем-A-QOL находятся в диапазоне от 0 до 100, при этом для каждой подоценки и общей оценки более высокие оценки представляют более существенное ухудшение QOL.

^b На основании 2-стороннего парного t-критерия.

^c По всем исходам, кроме занятий спортом и досуга (n=33), планирования семьи (n=30), партнерских отношений и половой сферы (n=45) и работы и учебы в школе (n=44), оценке подлежали 48

пациентов.

Выводы

[00304] Данные об эффективности из исследований фазы 3, представляющих собой опорное клиническое испытание rFVIIIIFc фазы 3 и опорное клиническое испытание rFVIIIIFc фазы 3 у детей, и продолжающегося расширенного исследования rFVIIIIFc демонстрируют устойчивые низкие показатели частоты кровотечений в суставах-мишенях в годовом исчислении (ABR) и эффективное восстановление суставов-мишеней у субъектов-детей, подростков и взрослых с тяжелой гемофилией А, проходящих долгосрочную профилактику с использованием rFVIIIIFc. Еженедельное профилактическое потребление фактора свертывания крови в этом анализе у субъектов, имеющих суставы-мишени на исходном уровне, согласовывалось с наблюдаемым в совокупных популяциях из ранее опубликованных исследований, представляющих собой опорное клиническое испытание rFVIIIIFc фазы 3 и опорное клиническое испытание rFVIIIIFc фазы 3 у детей. У субъектов, у которых восстанавливались суставы-мишени при прохождении профилактики с использованием rFVIIIIFc без изменений профилактического потребления фактора свертывания крови или интервала между введениями доз, наблюдалось улучшение качества жизни (QOL).

ПРИМЕР 2

Долгосрочные исходы в рамках модифицированных оценок функционального состояния суставов при гемофилии (mHJHS) при профилактике с использованием рекомбинантного слитого белка на основе фактора VIII и Fc (rFVIIIIFc) у субъектов с тяжелой формой гемофилии А

[00305] Гемофилическая артропатия остается проблемой при контроле гемофилии (Knobe et al., *J Comorbidity*. 2011;1(1):51-59; Simpson et al., *Expert Rev Hematol*. 2012;5(4):459-68). Оценка функционального состояния суставов при гемофилии (HJHS) является первоочередным инструментом, который можно использовать для обнаружения развития гемофилической артропатии (Ouzak et al. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(2):e80-5). Улучшение скелетно-мышечных исходов является важным показателем эффективности профилактического лечения гемофилии А (Blanchette et al.

Haemophilia. 2004;10 (Suppl. S4):97–104). Долгосрочные безопасность и эффективность rFVIIIFc среди взрослых/подростков и детей, которые прошли опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 (Mahlangu et al. *Blood*. 2014;123(3):317–325), и в исследованиях, относящихся к опорному клиническому испытанию rFVIIIFc фазы 3 у детей (Young et al. *J Thromb Haemost*. 2015;13(6):967–977), соответственно устанавливали с использованием промежуточных данных из продолжающегося расширенного исследования rFVIIIFc (Nolan et al. *Haemophilia*. 2016;22(1):72–80). Для определения долгосрочного влияния rFVIIIFc на скелетно-мышечные исходы потребуется дополнительное исследование.

[00306] Цель этого исследования заключается в документировании данных длительного наблюдения за функциональным состоянием суставов, полученных из опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 и расширенного исследования rFVIIIFc, с использованием модифицированных оценок функционального состояния суставов при гемофилии (mHJHS).

Участники и план исследования

[00307] Анализируемая популяция включала взрослых/подростков (≥ 12 лет), которые завершили опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3, и были включены в расширенное исследование rFVIIIFc на протяжении 2 лет. Пациенты могли проходить профилактику или эпизодическое лечение до исследования. Функциональное состояние суставов оценивали с использованием mHJHS при скрининге в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 (после изменения протокола), и на исходном уровне, и затем ежегодно впоследствии в течение расширенного исследования rFVIIIFc.

[00308] mHJHS отличается от стандартной HJHS версии 2.1 тем, что возможные варианты ответа при оценивании суставной боли и походки были сведены в меньшее количество категорий, была добавлена оценка нестабильности, и общая оценка является более низкой (в диапазоне 0–116; 0 указывает на нормальное функционирование сустава, 116 указывает на тяжелое заболевание) по сравнению со стандартной HJHS (в диапазоне 0–124) (см.

таблицу 4). Оценки, которым предшествовало кровотечение в рамках периода 2 недель, исключали. Оценки для суставов, которые подвергались хирургическому вмешательству, подставляли условно с помощью метода переноса данных последнего наблюдения вперед. Для оценивания изменения по годам в этот апостериорный анализ были включены субъекты из расширенного исследования rFVIIIFc, для которых имелись данные mHJHS в 4 момента времени (на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3, на исходном уровне в расширенном исследовании rFVIIIFc, в год 1 в расширенном исследовании rFVIIIFc и в год 2 в расширенном исследовании rFVIIIFc). Изменение оценки mHJHS от исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до года 2 в расширенном исследовании rFVIIIFc (отрицательное значение указывает на улучшение) суммировали с помощью описательной статистики. Изменение оценки mHJHS от исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до визитов последующего наблюдения суммировали по: (1) общей оценке (диапазон 0–116; по режиму лечения до исследования (профилактическому в сравнении с эпизодическим); по степени тяжести ухудшения функции, определенной на основании исходной mHJHS, и по наличию суставов-мишеней на исходном уровне); (2) суставам-мишеням (диапазон 0–19: сумма баллов по всем вопросам для одного сустава-мишени); (3) опорным (например, голеностопному и коленному) и неопорным (например, локтевому) суставам (диапазон 0–38: сумма для правого и левого суставов в одном местоположении) и (4) отдельным компонентам (объему движений (диапазон 0–36: совокупный балл по вопросам об "ограничении разгибания [тыльного сгибания в голеностопных суставах]" и "ограничении сгибания [подошвенного сгибания в голеностопных суставах]" для всех суставов); опуханию (диапазон 0–24: совокупный балл по вопросам об "опухании" и "длительности опухания" для всех суставов) и силе (диапазон 0–6: сумма для всех суставов)).

Таблица 4. Различия между HJHS и mHJHS

HJHS	mHJHS
Хруст при движении (с оценкой 0-2)	Хруст при движении (с оценкой 0 или 1)
Суставная боль (с оценкой 0-2)	Суставная боль (с оценкой 0 или 1)
Комплексная оценка походки (с оценкой 0-4)	Комплексная оценка походки (с описательной оценкой)
-	Нестабильность (с оценкой 0 или 1)
Общая оценка (0-124)	Общая оценка (0-116 ^а)

^а 0=нормальное функционирование сустава; 116=тяжелое заболевание.

[00309] Различия между исходным уровнем в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 и в год 2 расширенного исследования rFVIIIFc анализировали с использованием парного t-критерия. Значения *P* не применяли для оценки статистической значимости, так как данный анализ являлся специальным анализом. Для анализов подгрупп представлены данные только описательной статистики.

Результаты

Характеристики исходного уровня

[00310] Характеристики исходного уровня являлись сходными между популяцией завершивших испытание, включенных в данный анализ (n=47), и популяцией пациентов, для которых собирали mHJHS на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3, и которые были включены в расширенное исследование rFVIIIFc (n=74) (таблица 5).

Таблица 5. Характеристики исходного уровня

	Исходный уровень в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 и	Опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3 и завершившие год 2

	включенные в расширенное исследование rFVIIIFc n=74^a	расширенного исследования rFVIIIFc n=47^b
Средний (SD) возраст, годы	31,6 (11,9)	32,3 (12,8)
Средний (SD) вес при включении в первоначальное исследование, кг	72,7 (15,1)	73,5 (15,7)
Средний (SD) BMI, кг/м ²	23,8 (4,3)	24,0 (4,1)
Средняя (SD) оценка mHJS относительно исходного уровня	22,1 (18,0)	23,4 (18,3)
Суставы-мишени, %	55,4	51,1
Лечение до исследования, %	68,9	63,8
Профилактическое По необходимости	31,1	36,2
Средний (SD) ABR до исследования	15,8 (20,0)	16,5 (18,4)

^a 74 субъекта, проходящие профилактику посредством rFVIIIFc, включенные в опорное клиническое испытание rFVIIIFc фазы 3, получившие оценки mHJS, и в последующем, включенные в расширенное исследование rFVIIIFc. ^b 47 пациентов, проходящие профилактику, достигнувшие года 2 в расширенном исследовании rFVIIIFc с данным доступными для исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3, исходного уровня и 1 и 2 годов расширенного исследования rFVIIIFc.

Долгосрочное функциональное состояние суставов

[00311] Наблюдали непрерывное улучшение оценки mHJS относительно исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 на протяжении года 2 расширенного исследования rFVIIIFc со средним снижением общей оценки от 23,4 до 19,3 (фиг. 2А). Проводили оценку двадцати четырех из семидесяти четырех

субъектов в год 3 расширенного исследования, и эти улучшения оценок mHJHS наблюдали в год 3 расширенного исследования независимо от наличия суставов-мишеней на исходном уровне для опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 (фиг. 2B). Средняя продолжительность последующих наблюдений составляла 2,8 (2,5–3,3) года. Непрерывное улучшение наблюдали независимо от лечения пациента до исследования (фиг. 3) или наличия суставов-мишеней на исходном уровне в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 (фиг. 4). У таких пациентов, подвергнутых оценке в год 3 расширенного исследования, средняя общая оценка mHJHS для взрослых/подростков с использованием данных во все моменты времени составила 25,0 (стандартная ошибка среднего значения [SEM] составила 2,9) относительно исходного уровня. Среднее (SEM) изменение от исходного уровня составило -2,0 (1,2) на исходном уровне расширенного исследования, -3,8 (1,5) в год 1 расширенного исследования, -4,5 (1,6) в год 2 расширенного исследования и -5,1 (1,5) в год 3 расширенного исследования (фиг. 3B). Измерение от исходного уровня до года 3 расширенного исследования являлось статистически значимым ($P < 0,002$). Анализируемая популяция ($n=24$) опорного клинического испытания rFVIIIFc фазы 3 у детей также показала статистически значимое среднее (SEM) улучшение от исходного уровня до года 2 расширенного исследования (-1,2 [0,56]; $P < 0,05$) (фиг. 3C). Субъекты в самом верхнем квартиле ухудшения оценок mHJHS относительно исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 показали наиболее значительное улучшение общей оценки mHJHS от исходного уровня до года 2 расширенного исследования rFVIIIFc (фиг. 5). Непрерывное улучшение оценок mHJHS в отношении суставов-мишеней наблюдали от исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до года 2 расширенного исследования rFVIIIFc с улучшением от среднего значения 7,0 на исходном уровне до среднего значения 5,3 в год 2 расширенного исследования rFVIIIFc (фиг. 6). Оценки mHJHS в отношении суставов для опорных суставов снизились от среднего значения 8,0 до среднего значения 6,8, а для неопорных суставов от среднего значения 6,7 до среднего значения 4,8 от исходного

уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до года 2 расширенного исследования rFVIIIFc (фиг. 7). Для расчета оценки в отношении опорных (голеностопный сустав и коленный сустав) и неопорных суставов (локтевой сустав) оценку первоначально получали в качестве суммы оценок в отношении каждого сустава для пары правого и левого суставов (голеностопный сустав, коленный сустав или локтевой сустав). Затем оценку в отношении опорного сустава рассчитывали как среднее значение оценок в отношении голеностопного сустава и коленного сустава, а оценка в отношении неопорного сустава являлась идентичной оценке в отношении локтевого сустава. Кроме того, конкретные улучшения в отношении опухания, объема движений и силы также наблюдали от исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 до года 2 расширенного исследования rFVIIIFc, которые представляли собой наиболее значительные факторы, способствующие изменению общей оценки mHJHS (фиг. 8).

[00312] Статистически значимые средние показатели улучшения относительно исходного уровня в опорном клиническом испытании rFVIIIFc фазы 3 наблюдали в год 3 как для опорных, так и для неопорных суставов (-1,1 [SEM, 0,5; P=0,036] и -3,0 [SEM, 0,8; P=0,001] соответственно). Отдельные компоненты mHJHS, которые показали $\geq 20\%$ снижение от исходного уровня до года 3, представляли собой опухание (-47%), атрофию мышц (-26%), хруст (-20%) (P<0,05 для всех 3 компонентов) и нестабильность суставов (-89%), суставную боль (-31%) и силу (-26%) (фиг. 9).

ПРИМЕР 3

Исходы в отношении суставов-мишеней при профилактике с помощью rFIXFc у взрослых и подростков с гемофилией В

[00313] У пациентов с тяжелой формой гемофилии В повторные кровотечения в суставах без достаточного лечения могут вызвать приводящее к инвалидности хроническое заболевание суставов, боль и снижение качества жизни (Djambas Khayat, *J Blood Med.* 7:275-82 (2016)). Профилактическое лечение с использованием рекомбинантного слитого белка на основе фактора IX и Fc (rFIXFc) приводило к более низким показателям частоты кровотечений (ABR) в годовом исчислении и к меньшему количеству случаев

спонтанного/травматического кровотечения у взрослых и подростков с тяжелой формой гемофилии В (Kavakli et al., *Haemophilia* 22(3):381–88 (2016); Powell et al. *N Engl J Med.* 369(24):2313–23 (2013); Powell et al., *Br J Haematol.* 168(1):124–34 (2015); Powell et al., *Br J Haematol.* 168(1):113–23 (2015)). В дополнение к предупреждению повреждения суставов и снижению случаев кровотечения, профилактическое лечение как с использованием стандартного, так и с использованием длительно действующего rFIX может приводить к меньшему количеству времени, проведенного вне работы или учебного заведения, меньшему числу госпитализаций, менее частому наблюдению и улучшенному качеству жизни (Kavakli et al., *Haemophilia* 22(3):381–88 (2016); Wyrwich et al., *Haemophilia* 22(6):866–72 (2016)). Профилактическое лечение, начатое в раннем возрасте, уменьшает кровотечение и предупреждает повреждение суставов. При начале в более позднем возрасте, когда произошло повреждение суставов, профилактическое лечение все еще может значительно снизить количество кровотечений, включая кровотечения в суставах (Fischer et al., *Haemophilia* 20(Suppl 4):106–13 (2014)). Взрослые/подростки с тяжелой формой гемофилии В, которые завершили опорное клиническое испытание rFVIXFc фазы 3 (NCT01027364) могли быть включены в долгосрочное расширенное исследование (NCT01425723; Pasi et al., *Thromb Haemost.* 117(3):508–18 (2017)), в котором оценивали безопасность и эффективность rFVIXFc. Долгосрочные исходы у субъектов, имеющих суставы-мишени на момент включения в опорное клиническое испытание rFVIXFc фазы 3, для всего периода долгосрочного расширенного исследования приводятся в данном документе.

[00314] Целью данного исследования является представление данных в отношении долгосрочных исходов опорного клинического испытания rFVIXFc фазы 3 от субъектов, имеющих суставы-мишени на момент включения в исследование, по состоянию на дату прекращения сбора данных промежуточного анализа в рамках второго расширенного исследования (11 сентября 2015 г.).

Способы

План исследования и популяция

[00315] Субъектов с тяжелой формой гемофилии В (≤ 2 МЕ/дл эндогенного FIX), завершающих опорное клиническое испытание rFVIXFc фазы 3, включали в 1 из 4 групп лечения в расширенном исследовании: (1) с еженедельной профилактикой (WP; 20–100 МЕ/кг каждые 7 дней); (2) с профилактикой с индивидуализированными интервалами (IP; 100 МЕ/кг каждые 8–16 дней); (3) с модифицированной профилактикой (MP; исследователи могли регулировать введение доз с учетом персональных предпочтений у субъектов, у которых не может быть достигнута оптимальная профилактика при IP или WP); и (4) с эпизодическим лечением (ET; введение доз при необходимости с учетом типа и степени тяжести эпизодов кровотечения). Субъекты могли изменять свою группу лечения в момент включения в расширенное исследование и в любое время в течение исследования. Субъектов, которые изменяли группы лечения, включали в анализы каждой группы лечения на период, проведенный при данном режиме лечения, поэтому отдельные субъекты могут быть включены в более чем 1 группу лечения при анализе. Оценивали субъектов с ≥ 1 суставом-мишенью (крупный сустав с ≥ 3 эпизодами кровотечения в течение 3-месячного периода) на момент включения в опорное клиническое испытание фазы 3.

Показатели исходов и статистический анализ

[00316] Исходы анализировали в течение совокупной продолжительности опорного клинического испытания rFVIXFc фазы 3 по состоянию на дату прекращения сбора данных промежуточного анализа в рамках второго расширенного исследования B-YOND (11 сентября 2015 г.). Проводили анализ восстановления суставов-мишеней. Восстановление суставов-мишеней определяли как ≤ 2 эпизода спонтанного кровотечения в суставе-мишени на протяжении непрерывного 12-месячного периода (Blanchette et al., *J Thromb Haemost.* 12(11):1935–39 (2014)).

Результаты

[00317] Характеристики исходного уровня для субъектов с суставами-мишенями показаны в таблице 6. Из 117 субъектов из опорного клинического испытания rFVIXFc фазы 3 с данными в период исследования шестьдесят имели в общей сложности 166

суставов-мишеней на исходном уровне. Эти субъекты получали rFIXFc в течение совокупной медианной (межквартильный размах [IQR]) продолжительности 3,4 (1,4–4,2) года.

Таблица 6. Характеристики исходного уровня.

Характеристика	N=60
Режим до исследования	
Эпизодическое лечение	44 (73,3)
Профилактика	16 (26,7)
Количество суставов-мишеней	
1	20 (33,3)
2	13 (21,7)
3	7 (11,7)
>3	20 (33,3)
Местоположение сустава-мишени	
Коленный сустав	42 (70,0)
Голеностопный сустав	33 (55,0)
Локтевой сустав	28 (46,7)
Тазобедренный сустав	6 (10,0)
Плечевой сустав	3 (5,0)
Лучезапястный сустав	3 (5,0)

Все данные представлены как n (%). rFIXFc представляет собой рекомбинантный слитый белок на основе фактора IX с Fc. Включает субъектов с ≥ 1 суставом-мишенью на момент включения в исследование B-LONG и с периодом эффективности (определяемым как сумма всех временных интервалов, во время которых субъектов лечили с помощью rFIXFc в соответствии с режимами лечения исследования, исключая периоды хирургической реабилитации); сустав-мишень bA определяется как крупный сустав (например, коленный сустав, голеностопный сустав, локтевой сустав, тазобедренный сустав, плечевой сустав и лучезапястный сустав), в котором происходило повторное кровотечение (с частотой, составляющей ≥ 3 эпизодов кровотечения в одном и том же суставе в течение периода 3 последовательных месяцев).

Профилактическое введение доз

[00318] Средние еженедельные дозы и интервал между введениями доз обобщены в таблице 7.

Таблица 7. Обобщенные результаты средних профилактических доз rFIXFc и интервал между введениями доз

Группа лечения	WP (n=40)	IP (n=12)	MP (n=12)
----------------	--------------	--------------	--------------

Средняя еженедельная доза, МЕ/кг	45,2 (37,3–55,8)	64,7 (46,7–82,3)	59,7 (40,0–109,8)
Интервал между введениями доз, дн.	6,98 (6,9–7,0)	10,25 (8,9–13,2)	6,57 (4,9–6,9)

Все данные являются медианными (IQR). IP означает профилактику с индивидуализированными интервалами; MP означает модифицированную профилактику; rFIXFc означает рекомбинантный слитый белок на основе фактора IX и Fc; WP означает еженедельную профилактику. В данный анализ включали только субъектов с доступными данными в период исследования в отношении дозы и интервала между введениями доз. Субъектов включали в каждый режим лечения, в котором они принимали участие, на период времени их участия в режиме, и, таким образом, они могут фигурировать в более чем одном режиме лечения.

Показатели частоты кровотечений

[00319] Данные в отношении кровотечений до исследования и в период исследования показаны на фиг. 10А и 10В соответственно. Субъектами, получающими профилактику с помощью rFIXFc, у которых не происходило повторное кровотечение в суставе-мишени в период исследования, являлись следующие: WP: 15 из 40 (37,5%); IP: 1 из 12 (8,3%); MP: 4 из 12 (33,3%); ET: 0 из 14 (0%). У субъектов с суставами-мишенями на исходном уровне совокупные ABR и ABR для суставов-мишеней в период исследования при применении профилактики с помощью rFIXFc были более низкими, чем показатели частоты кровотечений при лечении до исследования (фиг. 10А и 10В).

Показатели частоты кровотечений в годовом исчислении для двадцати двух субъектов, получавших лечение с интервалом между введениями доз ≥ 14	Субъекты, получающие лечение с ≥ 14-дневным интервалом между введениями доз (N=22)	Субъекты, завершившие лечение при ≥ 14-дневном интервале между введениями доз, и с ≥ 18-месячной эффективной продолжительностью
--	---	--

дней, а также шестнадцати субъектов, которые завершили лечение при интервале между введениями доз ≥ 14 дней, показаны в таблице 8.		(n=16)
Совокупная ABR	1,7 (0,6-4,2)	1,4 (0,6-2,0)
ABR для спонтанных случаев	0,7 (0,3-1,3)	0,7 (0,3-1,0)
ABR суставов	1,1 (0,3-2,7)	0,6 (0,2-1,5)
ABR для спонтанных кровотечений в суставах	0,3 (0,0-1,3)	0,3 (0,0-0,8)

Восстановление суставов-мишеней

[00320] В целом, восстановились 100% (93/93) суставов-мишеней (у 37 субъектов), на что указывают два или менее эпизодов спонтанного кровотечения в течение периода двенадцати месяцев (фиг. 11).

Выводы

[00321] У взрослых/подростков с тяжелой формой гемофилии В долгосрочная профилактика с помощью rFIXFc привела к восстановлению суставов-мишеней у 100% субъектов с оцениваемыми суставами-мишенями на исходном уровне и к низким ABR для суставов-мишеней во всех группах лечения. Клиницистам следует принять во внимание благоприятные и значительно улучшенные долгосрочные исходы для пациентов с суставами-мишенями, достигнутые с помощью rFIXFc при проектировании планов профилактического лечения.

ПРИМЕР 4

Исследование биораспределения ^{125}I -меченых FIXFc, FIX и гликопегилированного FIX в мышцах HemB с помощью однофотонной эмиссионной томографии (SPECT) in vivo

[00322] Проводили *in vivo* исследование на мышцах для оценки

биораспределения белков FIX в несколько моментов времени после введения дозы с применением однофотонной эмиссионной томографии (SPECT) *in vivo*. Белки FIX метили по остаткам лизина с использованием ^{125}I -меченого SIB-линкера. Меченые белки FIX вводили мышам NemB возрастом 7–12 недель в виде однократной терапевтически значимой дозы. ^{125}I -SIB-FIX вводили в виде однократной дозы 1 мг/кг (n=3); ^{125}I -SIB-FIXFc вводили в виде однократной дозы 2 мг/кг (n=3), и ^{125}I -SIB-FIX-PEG вводили в виде однократной дозы 1 мг/кг (n=3).

[00323] Изображения локализации меченых белков FIX получали при 0,5 ч., 2,5 ч., 20 ч., 48 ч., 92 ч., 120 ч., 168 ч. и/или 216 ч. (фиг. 10A–10C). Специфическую локализацию в областях суставов (например, левом/правом коленном суставе и левом/правом плечевом суставе), сердце (левом желудочке) и печени анализировали с использованием выбора представляющей интерес области (ROI). ROI левого желудочка и печени представляли собой объекты с фиксированным объемом, размещенные в пределах надлежащего органа. ROI коленного сустава определяли посредством размещения цилиндра вокруг кости от примерно нижней половины бедренной кости до верхней половины большеберцовой/малоберцовой кости. ROI плечевого сустава определяли посредством размещения однородной сферы в центре плечевого сустава, затем подбирая пороговое значение для кости в пределах данной сферы с последующим расширением ROI.

[00324] Обнаружили, что меченый FIXFc распределялся в области вокруг суставов через 30 минут (фиг. 12D) и 2,5 ч. (фиг. 12E) после введения дозы, что продолжалось в течение 48–216 ч. после введения дозы (фиг. 12F–12G), представляя период полужизни и пятикратный период полужизни соответственно. Локализация FIXFc в коленных суставах (фиг. 13A) и плечевых суставах (фиг. 13B) являлась более выраженной, чем локализация FIX и гликопегилированного Fv тех же областях суставов.

[00325] Мечение ^{125}I -SIB не затронуло активность FIX меченых белков FIX (фиг. 14A), также мечение не затронуло фармакокинетические свойства белков FIX по сравнению с немечеными белками FIX после введения мышам NemB (фиг. 14B).

ПРИМЕР 5

Оценка суставов на исходном уровне

[00326] Оценка суставов на исходном уровне

[00327] Шесть суставов (левый голеностопный сустав – LA, правый голеностопный сустав – RA, левый локтевой сустав – LE, правый локтевой сустав – RE, левый коленный сустав – LK, правый коленный сустав – RK) подлежали оценке по шкале от 0 до 19 в соответствии со следующими критериями: опухание, длительность, атрофия мышц, хруст, ограничение сгибания, ограничение разгибания, нестабильность, суставная боль и сила. Походка подлежит оценке по шкале от 0 до 2 на основании оценивания ходьбы и подъема по лестнице. Общая оценка будет представлять собой сумму оценок, полученных в отношении всех 6 суставов вместе с оценкой походки (в диапазоне 0–116, при этом 0 означает норму, а 116 означает наиболее тяжелую степень заболевания).

[00328] Скрининговый визит

[00329] Локтевой сустав, коленный сустав и голеностопный сустав каждой стороны тела будут оценивать в отношении заболевания суставов при скрининге. Функционирование сустава следует оценивать в отсутствие активного эпизода кровотечения. Нулевая оценка в отношении сустава отражает нормальный статус.

[00330] Детали оценивания

[00331] 1. Оценка в отношении суставов будет осуществляться отдельно для 6 суставов (LA, RA, LE, RE, LK, RK) в соответствии со данными категориями и шкалами (диапазон 0–19 для каждого сустава и 0–114 для всех шести суставов): опухание (0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное); длительность опухания (0=отсутствие опухания или \leq 6 месяцев; 1 = >6 месяцев); атрофия мышц (0=отсутствует; 1=легкая; 2=сильная); хруст при движении (0=отсутствует; 1=присутствует); ограничение сгибания, в том числе ограничение подошвенного сгибания в голеностопных суставах (0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное); ограничение разгибания, в том числе ограничение тыльного сгибания в голеностопных суставах (0=отсутствует; 1=легкое; 2=умеренное; 3=сильное); нестабильность (0=отсутствует; 1=значительная патологическая гиперподвижность

сустава); суставная боль (0=отсутствие боли в пределах объема либо в конечной точке объема движений; 1=наличие боли); сила (0=нормальная (положение удерживается с преодолением силы тяжести и максимального сопротивления); 1=минимальное уменьшение (положение удерживается с преодолением силы тяжести и умеренного сопротивления, но не максимального сопротивления); 2=легкое уменьшение (положение удерживается с преодолением силы тяжести или минимального сопротивления); 3=умеренное уменьшение (способность выполнять движения в суставе при устранении силы тяжести); 4=сильное уменьшение (остаточное или отсутствующее мышечное сокращение). Для оценивания ограничения сгибания и ограничения разгибания в коленных суставах и локтевых суставах применимо следующее: отсутствует=примерно 0–5 градусов; легкое=примерно 5–10 градусов; умеренное=примерно 11–20 градусов и сильное=примерно > 20 градусов.

[00332] 2. Походку будут оценивать однократно (диапазон 0–2), где 0=отсутствие трудностей при ходьбе или подъеме/спуске по лестнице; 1=отсутствие трудностей при ходьбе, но наличие трудностей при перемещении по лестнице; и 2=трудности при ходьбе и при перемещении по лестнице.

[00333] Данная модифицированная оценка функционального состояния суставов при гемофилии (HJHS) основана на системе оценивания, использованной в исследовании надежности оценивания суставов у мальчиков с гемофилией (Hilliard, Funk et al., *Haemophilia* 12(5):518–525 (2006), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Ее использовали в качестве инструмента для оценивания скелетно-мышечных исходов в когорте из 20 мальчиков с возрастом 4–17 лет (Saulyte Trakumiene, Ingerslev et al., *Haemophilia* 16(3):479–486 (2010), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Модификации выполняли для адаптации системы оценки для взрослой популяции с гемофилией и согласно комментариям в недавнем валидационном исследовании международной исследовательской группы по профилактике гемофилии (Feldman, Funk et al., *Arthritis Care Res* (Hoboken), 2010, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей

полноте).

ПРИМЕР 6

[00334] Основным осложнением заместительной терапии фактором при гемофилии А является появление ингибиторов (нейтрализующих антител к фактору VIII) у ~30% пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Выработка ингибиторов влияет на эффективность лечения, а также на качество жизни индивидуумов, подвергшихся негативному воздействию. Для дополнительного понимания того, как иммунная система отвечает на рекомбинантный фактор III (rFVIII), продолжают предприниматься усилия по исследованию гемофилии с целью эффективного устранения ингибиторов. Слитый белок на основе rFVIII и Fc (rFVIII-Fc) с увеличенным периодом полужизни является эффективным и хорошо переносимым средством терапии для предупреждения и контроля эпизодов кровотечения. Fc-область данной молекулы не только ответственна за увеличение периода полужизни rFVIII, но и может стимулировать антигенспецифическую толерантность, как показано в доклиническом исследовании на модельном животном (Krishnamoorthy S, et al., *Cell Immunol.* 301:30–39 (2016)) и как свидетельствуют клинические случаи индуцирования иммунологической толерантности (Groomes CL, et al., *Pediatr Blood Cancer* 63(5):922–24 (2016); Malec LM, et al., *Haemophilia* 22(6):e552–e554 (2016); Ragni MV, et al., *Haemophilia* 22(5):e462–e464 (2016)).

[00335] Способы

[00336] APC или моноциты TLR-1 человека из периферической крови применяли для исследования эффектов rFVIII-Fc в отношении связывания FcγR, его интернализации, опосредованной им передачи сигнала и выработки цитокинов и изменений экспрессии генов, а также последующих взаимодействий с Т-клетками и эффектов в их отношении *in vitro* (фиг. 16).

[00337] Результаты

[00338] Сниженная экспрессия FcγR на клеточной поверхности свидетельствовала об интернализации при обработке с помощью rFVIII-Fc (фиг. 17А–17С). Моноцитарные макрофаги и дендритные клетки обрабатывали иммунными комплексами с пероксидазой хрена (HRP-IC) в качестве положительного контроля, иммуноглобулином G1

человека (IgG1) в качестве отрицательного контроля и рекомбинантным фактором VIII (rFVIII) или слитым белком rFVIII-Fc (rFVIIIIFc) в эквимоллярных концентрациях (200 нМ) в течение 24 часов. Экспрессию Fc γ -рецепторов (Fc γ R) CD16 (фиг. 17A), CD32 (фиг. 17B) и CD64 (фиг. 17C) на клеточной поверхности измеряли с помощью проточной цитометрии (n=3; **P \leq 0,01, ***P \leq 0,005, значимость для HRP-IC относительно других средств обработки не показана). Обработка с помощью rFVIIIIFc коррелировала со сниженной экспрессией CD16 (фиг. 17A), CD32 (фиг. 17B) и CD64 (фиг. 17C) на клеточной поверхности по сравнению с поверхностной экспрессией после обработки с помощью rFVIII.

[00339] rFVIIIIFc вовлекал Fc γ R и индуцировал передачу сигналов у моноцитов и макрофагов без последующей выработки провоспалительных цитокинов (фиг. 18A-18C). Клеточную линию моноцитов THP-1, моноциты, моноцитарные макрофаги из периферической крови и моноцитарные дендритные клетки из периферической крови обрабатывали с помощью HRP-IC, IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc в течение 15 минут (фиг. 18A). Фосфорилирование Syk измеряли в клеточных лизатах с применением платформы MSD (n=3-7, *P \leq 0,05). Фосфорилирование Syk измеряли после обработки макрофагов с помощью rFVIIIIFc (WT), мутантного rFVIIIIFc, который не способен связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn-мутант), или мутантного rFVIIIIFc, который не способен связываться с Fc γ R (Fc γ R-мутант) (n=4, *P \leq 0,05) (фиг. 18B). Выработку провоспалительных цитокинов макрофагами, которых подвергали двадцатичетырехчасовой обработке, измеряли с помощью ELISA на платформе MSD (n=4, значимость не указана) (фиг. 18C).

[00340] rFVIIIIFc обеспечивал фосфорилирование молекул, принимающих участие в иммунорегуляции, а не молекул, играющих роль в активации и выработке провоспалительных цитокинов (таблица 9 и фиг. 19). Поиск фосфорилированных белков в лизатах моноцитарных макрофагов, обработанных с помощью rFVIIIIFc в течение пятнадцати минут, осуществляли с применением наборов с фосфокиназами и фосфорилированными иммунорецепторами Proteome Profiler. Перечень фосфорилированных молекул в обработанных с помощью rFVIIIIFc макрофагах, идентифицированных с помощью

анализов посредством Proteome Profiler, показан в таблице 9. Фосфорилирование фосфатаз, ответственных за передачу ингибирующих сигналов, измеряли с применением платформы MSD ($n=3$; $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,005$) (фиг. 19).

Таблица 9. Фосфорилированные молекулы в обработанных с помощью rFVIIIFc макрофагах, идентифицированные с помощью анализов посредством Proteome Profiler.

Фосфорилированные белки						
Иммунорецепторы	ILT6/CD85e	NKp46/NCR 1	FcH5/IRTA2	Киназы	SRC	STAT5
	KIR2DL4	Siglec9	Siglec2/CD22		CREB	cJun
	SLAMF8	SLAMF4	CDCIR/CLEC4 α		pRAS40	p53
	Fc γ RIIIA/B	Fc γ RIIA	DECTIN- 1/CLEC7 α		ERK1/2	WNK1
	PECAM/CD31	FcRH4/IRT A1	KNKp44/NCR2		HSP27	p70S6
	CLEC-2	SHP2	Siglec7		JNK1/2 /3	FAK
	TREM2	ILT2/CD85 j	SLAMF5		AMPK α 2	GSK- 3 α/β
	SHP1	ILT3/CD85 k	Siglec3/CD33		STAT2	RSK1/2/ 3
	TREML1/TLT- 1	ILT4/CD85 d	Siglec5		STAT6	p53

[00341] rFVIIIFc индуцировал паттерн экспрессии генов, характерный для толерогенных макрофагов (фиг. 20A–20G). Проводили исследовательское секвенирование РНК с применением моноцитарных макрофагов, обработанных с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIFc в течение шести часов ($n = 3$), в отношении генов, экспрессия которых была значительно снижена (фиг. 20A), и в отношении генов, экспрессия которых была значительно повышена (фиг. 20B), и проводили анализ путей в отношении генов, экспрессия которых была повышена с помощью rFVIIIFc, с целью исследования молекулярных путей, избирательно представленных в этих клетках по сравнению с клетками, обработанными с помощью

rFVIII (таблица 9). Было обнаружено, что экспрессия различных генов сигнальных путей NRF2 и PPAR-гамма, а также различных других иммунорегуляторов была повышена (фиг. 20H). Выбранные гены сигнальных путей NRF2 и путей метаболизма липидов проверяли с помощью Q-PCR (n=8; *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,005) (фиг. 20C-20G). Кроме того, было обнаружено, что rFVIIIIFc-обученные макрофаги проявляют характерный M2-подобный фенотип (фиг. 20I-20M). В частности, макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией CD206, чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 6 часов (фиг. 20I) и через 24 часа (фиг. 20J), и макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией ARG1, чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 24 часа (фиг. 20M).

Таблица 9. Результаты проведенного анализа сигнальных путей в отношении генов, экспрессия которых была повышена с помощью rFVIIIIFc, с целью исследования молекулярных путей, избирательно представленных в этих клетках по сравнению с клетками, обработанными с помощью rFVIII.

Название пути	Заданный размер	Содержавшиеся кандидаты	P-значение	q-значение
Сигнальный путь NRF2	142	10 (7,0%)	4,07e-06	0,000273
Метаболизм липопротеинов	68	7 (10,3%)	1,01e-05	0,000338
Расщепление, мобилизация и транспорт липидов	110	8 (7,3%)	3,06e-05	0,000684
Метаболизм цистеина и метионина - Homo sapiens (человек)	45	5 (11,1%)	0,000137	0,00229
Сеть транскрипционных факторов C-MYB	86	6 (7,0%)	0,000389	0,00521
Сигнальный мета-путь ядерных рецепторов	316	11 (3,5%)	0,000813	0,00908

[00342] Обработанные с помощью rFVIIIIFc антигенпрезентирующие клетки влияли на дифференцировку регуляторных Т-клеток, для которой необходим клеточный контакт между APC и Т-клетками (фиг. 21А-21С). Моноцитарные макрофаги из

периферической крови обрабатывали с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc, затем подвергали совместному культивированию с необученными CD4-положительными Т-клетками, выделенными из периферической крови от того же донора. Спустя шесть дней совместного культивирования (фиг. 21A) процентную долю регуляторных Т-клеток (CD4+ CD25+ FoxP3+) количественно оценивали с помощью проточной цитометрии (n=4) (фиг. 21B). Также количественно оценивали процентную долю регуляторных Т-клеток при культивировании необученных Т-клеток в средах, кондиционированных APC, предварительно обработанными с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc (n=4) (фиг. 21C).

[00343] Вывод

[00344] rFVIIIIFc, по-видимому, связывал Fcγ-рецепторы на APC и индуцировал их интернализацию и опосредованную ими передачу сигналов. Эта передача сигналов не переходила в выработку провоспалительных цитокинов и не активировала APC (данные не показаны). После обработки с помощью rFVIIIIFc инициировались события передачи иммуномодулирующих сигналов. Эти события, по-видимому, направляют дифференцировку макрофагов в сторону M2-подобного фенотипа, характеризующегося повышенной экспрессией генов сигнальных путей NRF2 и PPARγ (фиг. 20H), а также повышенной экспрессией молекул CD206 и аргиназы 1. Повышенную экспрессию также демонстрировали и различные другие иммунорегуляторы, в то время как по меньшей мере растворимая бета-субъединица гуанилатциклазы 1 (2GUCY1B2), протопорфириногеноксидаза (PPOX) и супрессор передачи цитокиновых сигналов 3 (SOCS3) характеризовались сниженной экспрессией в клетках, обработанных с помощью rFVIIIIFc (фиг. 20H). Эти макрофаги могут оказывать полезные иммунологические эффекты, о которых сообщалось ранее, такие как дифференцировка регуляторных Т-клеток, толерантность к FVIII и снижение уровня ингибирующих антител к FVIII (фиг. 22 и 23).

ПРИМЕР 7

[00345] Фармакокинетический (PK) профиль фактора IX (FIX) согласуется с двухкамерной моделью, где FIX главным образом распределяется в пространство вне плазменного компартмента

(внесосудистое пространство). Авторами настоящего изобретения было ранее показано с использованием СПЕКТ-визуализации, что профили биораспределения rFIXFc и rFIX у мышей с гемофилией В соответствуют гипотезе, что FIX может распределяться в ткани вне плазменного компартмента, тогда как гликопегилированный rFIX остается главным образом в плазменном компартменте ввиду модификаций, обусловленных фрагментом PEG. В данном исследовании авторы настоящего изобретения оценивали распределение rFIX и rFIXFc у отличных от человека приматов (NHP).

[00346] rFIXFc и rFIX метили по остаткам лизина с использованием 124I-SIB (сукцинимидилдобензоата). Макаки-крабоеды получали однократную болюсную инъекцию IV исследовательской дозы ~2 мКи 124I-SIB-rFIXFc (2 мг/кг) или 124I-SIB-rFIX (1 мг/кг). Реконструированные PET/CT-сканогаммы всего тела использовали для получения изображений проекций максимальных интенсивностей (MIP), и биораспределение *in vivo* определяли для анализа представляющих интерес областей (ROI).

[00347] PET-визуализация у NHP показала раннее распределение 124I-SIB-rFIXFc и 124I-SIB-rFIX в пул крови, сердце, печень и почки. В более поздние моменты времени как rFIXFc, так и rFIX продемонстрировали распределение в плечевые суставы, а также другие суставы костей (лучезапястный сустав, голеностопный сустав и челюстной сустав), при этом rFIXFc показал значительно более высокое распределение в эти области даже в моменты времени, когда уровни FIX в плазме крови находились ниже предела обнаружения. Как *in vivo*, так и *ex vivo* данные продемонстрировали выведение rFIXFc и rFIX из пула крови. Данные об осаждении с помощью TCA показали, что >95% радиоактивности ассоциировано с FIX.

[00348] Профили биораспределения rFIXFc и rFIX у NHP являются аналогичными профилям, наблюдаемым у мышей с гемофилией В, и соответствуют гипотезе, что FIX может распределяться в ткани вне плазменного компартмента. Значительно более высокое распределение rFIXFc в области суставов по сравнению с rFIX может потенциально отражать задержку в этих тканях посредством Fc-опосредованного механизма или улучшенной РК. В то время как

роль внесосудистого распределения в предупреждении кровотечений и общей защите функционального состояния суставов остается областью для исследования, данное исследование согласуется с наблюдениями у мышей, что продемонстрированные различия биораспределения для вариантов FIX позволяют предположить, что их уровни в плазме крови могут не являться сопоставимыми или не иметь одно и то же значение среди вариантов FIX.

[00349] Предшествующее описание конкретных вариантов осуществления настолько полно раскрывает общий характер настоящего изобретения, что другие могут, используя знания в пределах квалификации в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать такие конкретные варианты осуществления для различных путей применения без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления, основанных на идее и принципе, представленных в данном документе. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для целей описания, а не ограничения, вследствие этого терминологию или формулировки в настоящем описании квалифицированному специалисту следует интерпретировать в свете этих идей и принципов.

[00350] Другие варианты осуществления изобретения будут понятны специалистам в данной области техники при рассмотрении описания и практического применения описанного здесь изобретения. Предполагается, что описание и примеры должны рассматриваться только как иллюстративные, а действительный охват изобретения и его идея изложены в нижеследующей формуле изобретения.

[00351] Все публикации, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения обратимой гемофилической артропатии сустава-мишени у человека, имеющего гемофилию В, включающий введение химерного белка, содержащего фактор IX (FIX) и первую Fc-область, в дозе от 20 МЕ/кг до 300 МЕ/кг, где человек имеет возраст 12 лет или больше, и где обратимая гемофилическая артропатия представляет собой гемофилическую артропатию стадии I, II и/или III.

2. Способ по п. 1, где обратимая гемофилическая артропатия включает синовит, микрокровоотечение или и то и другое.

3. Способ регрессии имеющегося ремоделирования сосудов в суставе человека, имеющего гемофилию В, включающий введение химерного белка, содержащего фактор IX (FIX) и Fc-область, в дозе от 20 МЕ/кг до 300 МЕ/кг.

4. Способ по п. 3, где введение химерного белка уменьшает ангиогенез и частоту возникновения микрокровоотечений в суставах.

5. Способ по п. 3 или 4, где человек имеет возраст 12 лет или больше.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где химерный белок вводят в дозе от 20 МЕ/кг до 100 МЕ/кг.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где химерный белок вводят в дозе от 25 МЕ/кг до 65 МЕ/кг.

8. Способ по любому из пп. 1-5, где химерный белок вводят в дозе от 50 МЕ/кг до 100 МЕ/кг.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где в результате введения у человека улучшается оценка функционального состояния суставов (HJHS).

10. Способ по любому из пп. 1-9, где в результате введения у человека уменьшается интенсивность суставной боли.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где сустав выбран из группы, состоящей из одного или обоих локтевых суставов, одного или обоих коленных суставов, одного или обоих голеностопных суставов, одного или обоих плечевых суставов, одного или обоих тазобедренных суставов, одного или обоих лучезапястных суставов, одного или нескольких суставов кисти руки, одного или нескольких суставов стопы и любой их комбинации.

12. Способ по любому из пп. 1-11, дополнительно включающий идентификацию человека, нуждающегося в лечении, с помощью системы визуализации, выбранной из группы, состоящей из системы для рентгенографии, магнитно-резонансной томографии, ультразвукового исследования, энергетической ультразвуковой доплерографии или любой их комбинации.

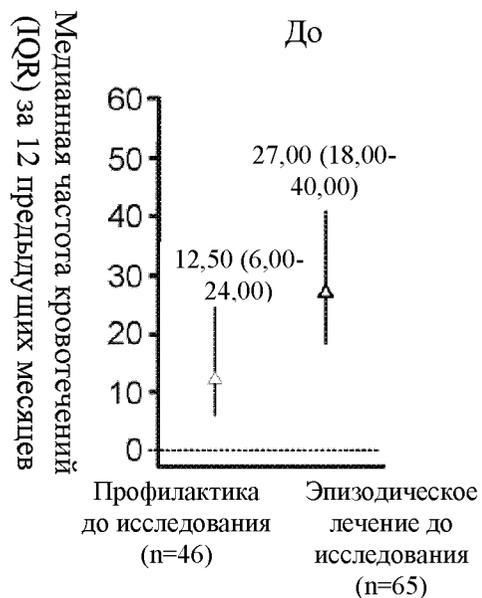
13. Способ по любому из пп. 1-12, где химерный белок, содержащий FIX-Fc, вводится с интервалом между введениями доз, составляющим два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней, десять дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня или 24 дня.

14. Способ по любому из пп. 1-5, где химерный белок, содержащий FIX-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от 3 до 5 дней.

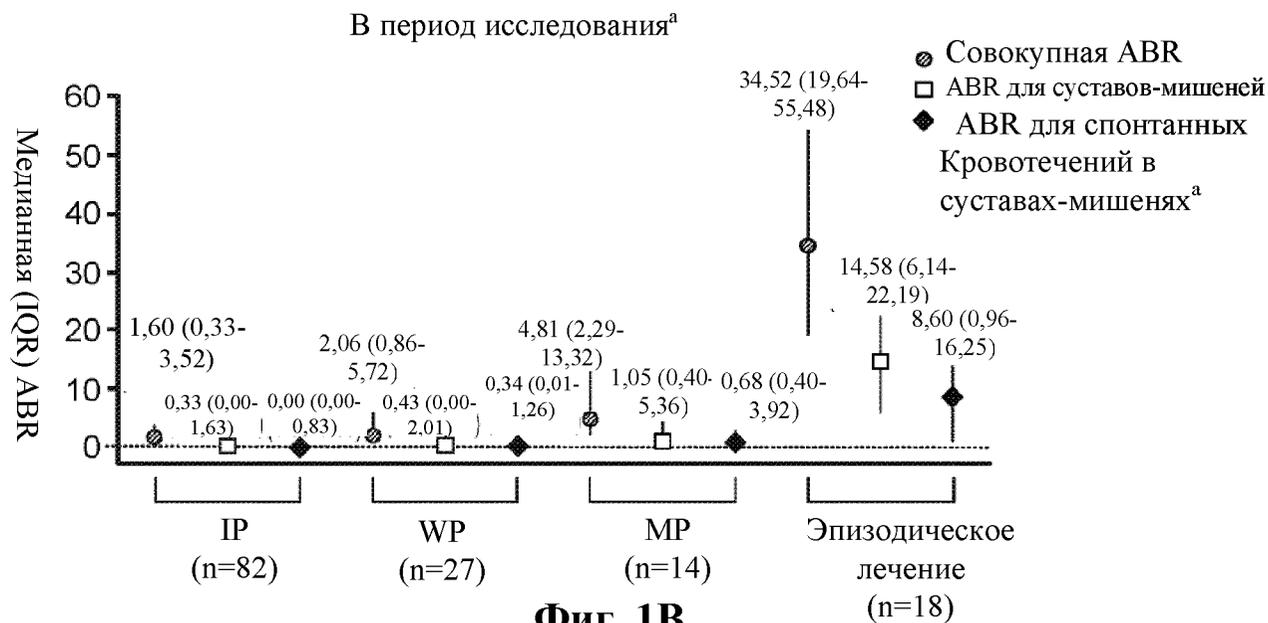
15. Способ по любому из пп. 1-14, где фактор свертывания крови распределяется в тканях вне плазменного компартмента, а также в плазменном компартменте.

16. Способ по п. 1-16, где химерный домен содержит вторую Fc-область, которая связана с первой Fc-областью посредством дисульфидной связи.

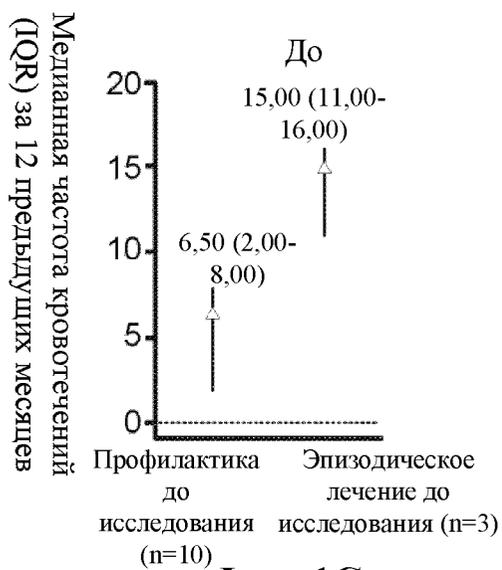
По доверенности



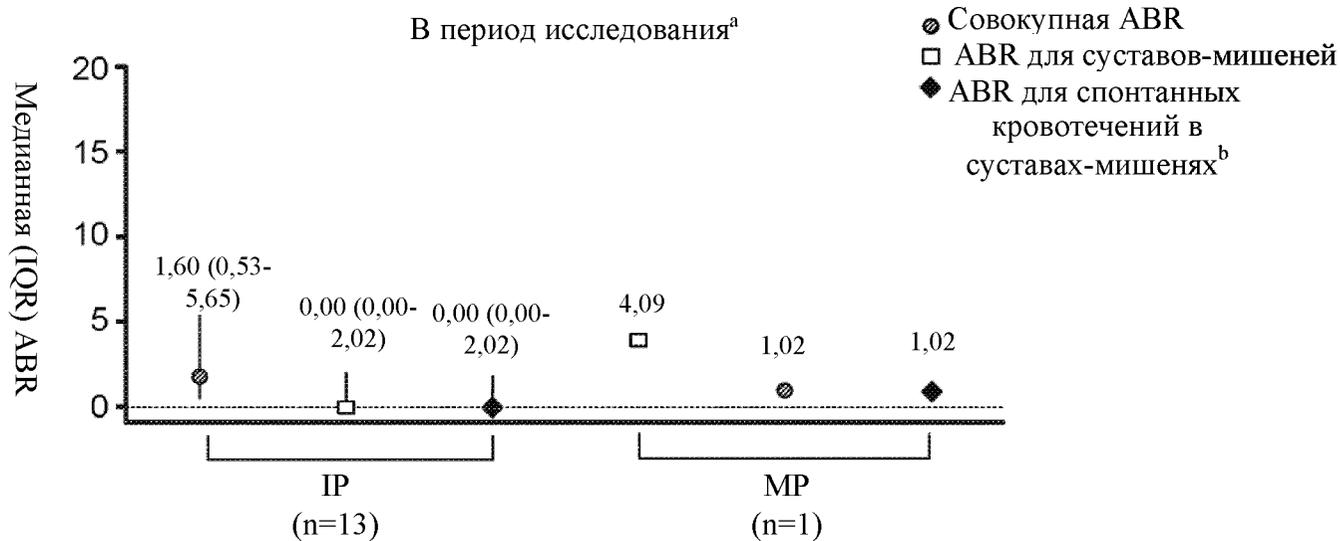
Фиг. 1А



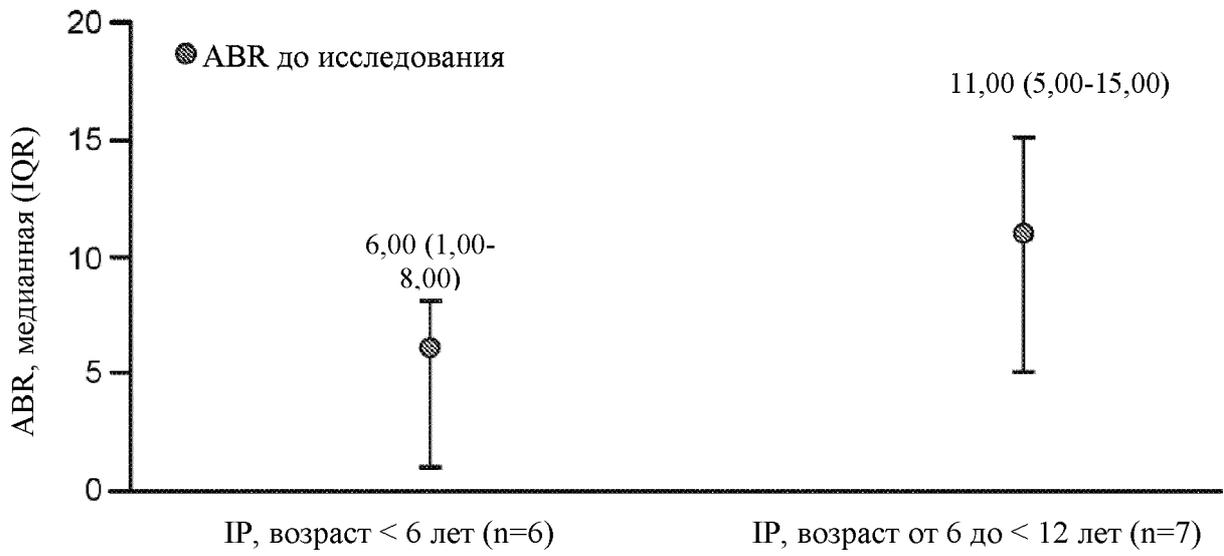
Фиг. 1В



Фиг. 1С



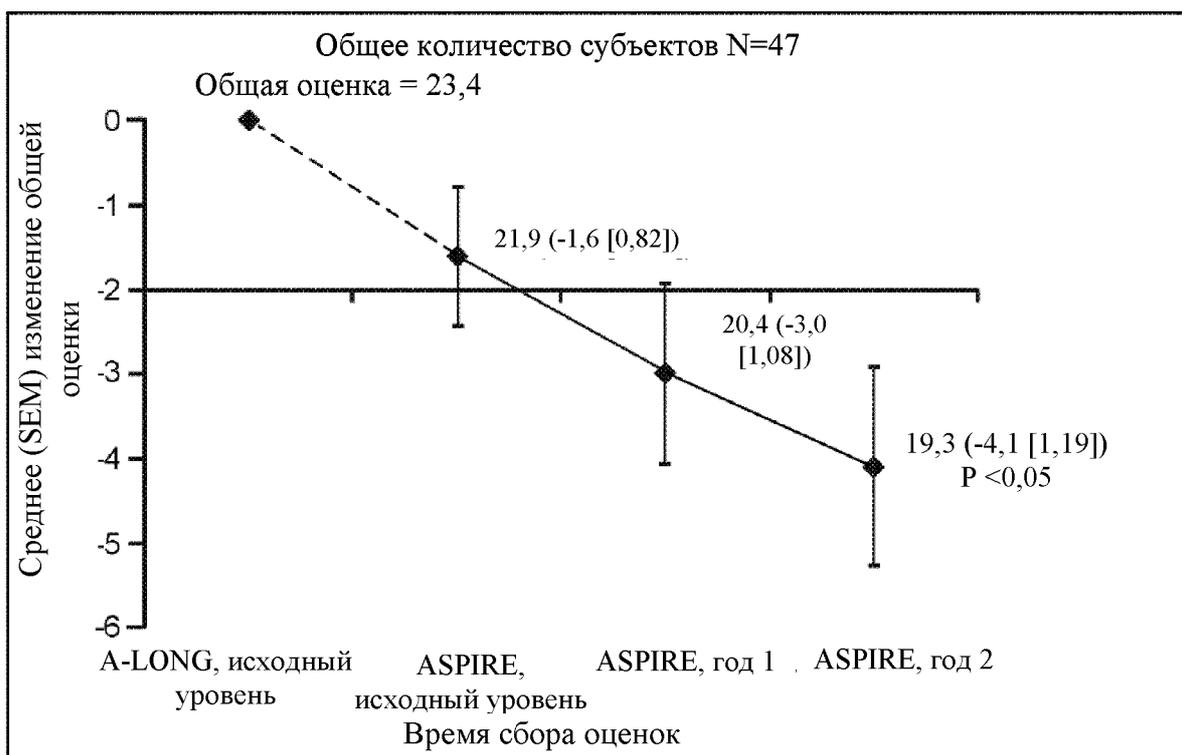
Фиг. 1D



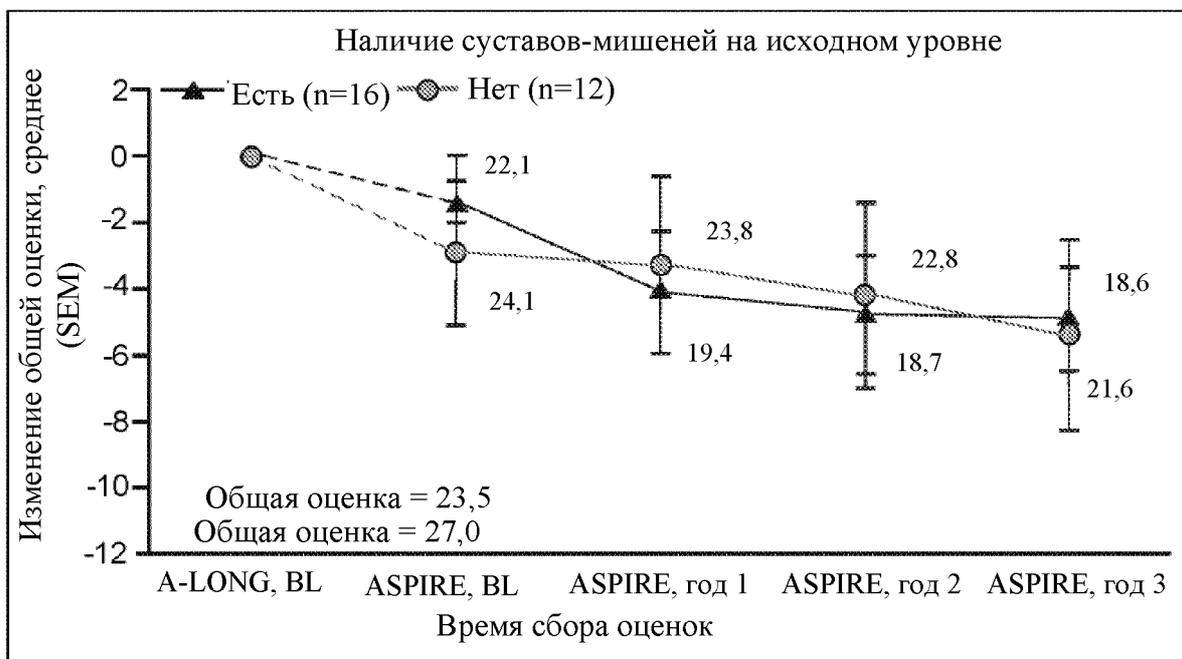
Фиг. 1Е



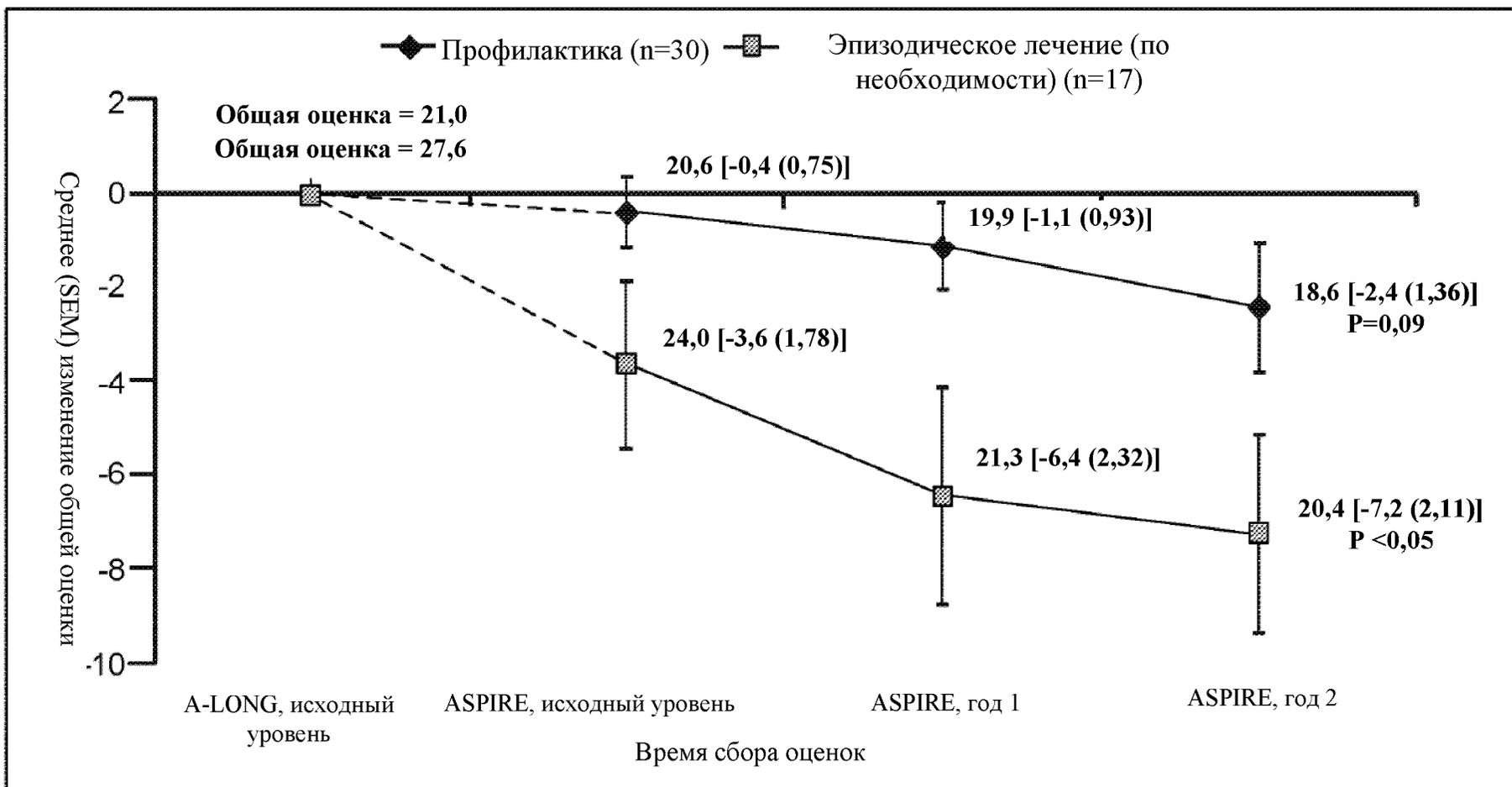
Фиг. 1F



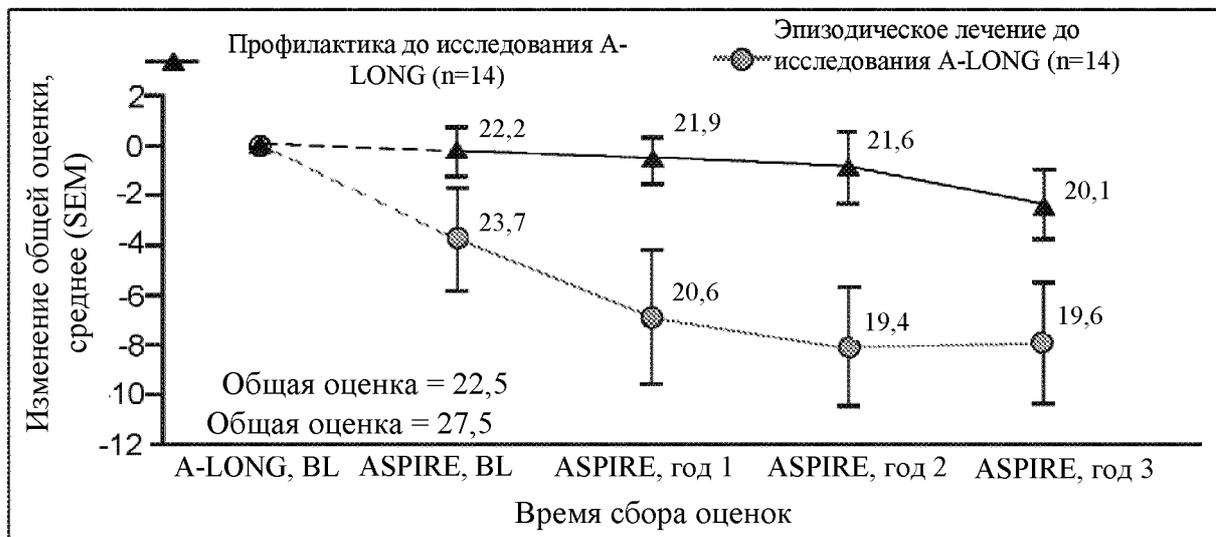
Фиг. 2А



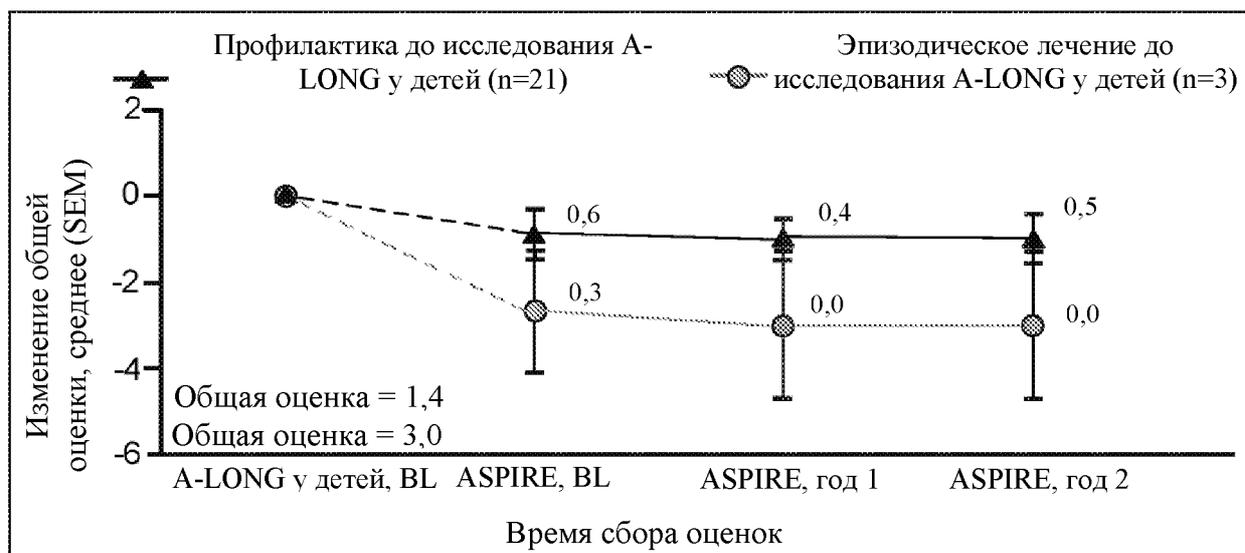
Фиг. 2В



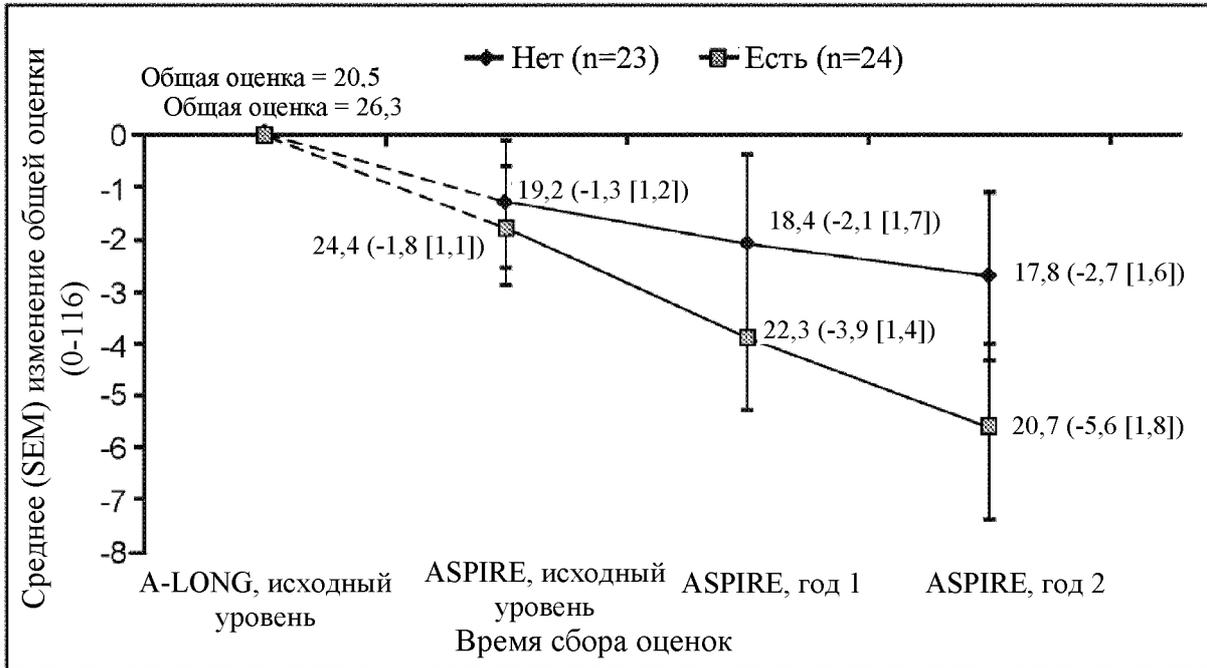
Фиг. 3А



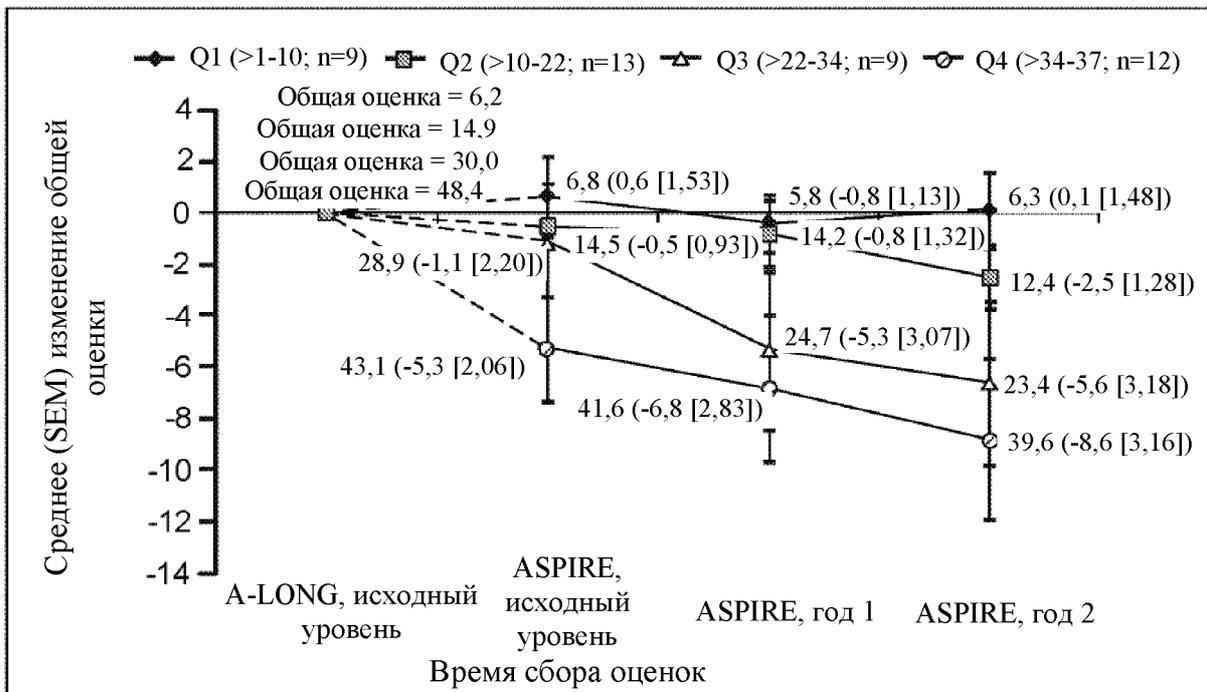
Фиг. 3В



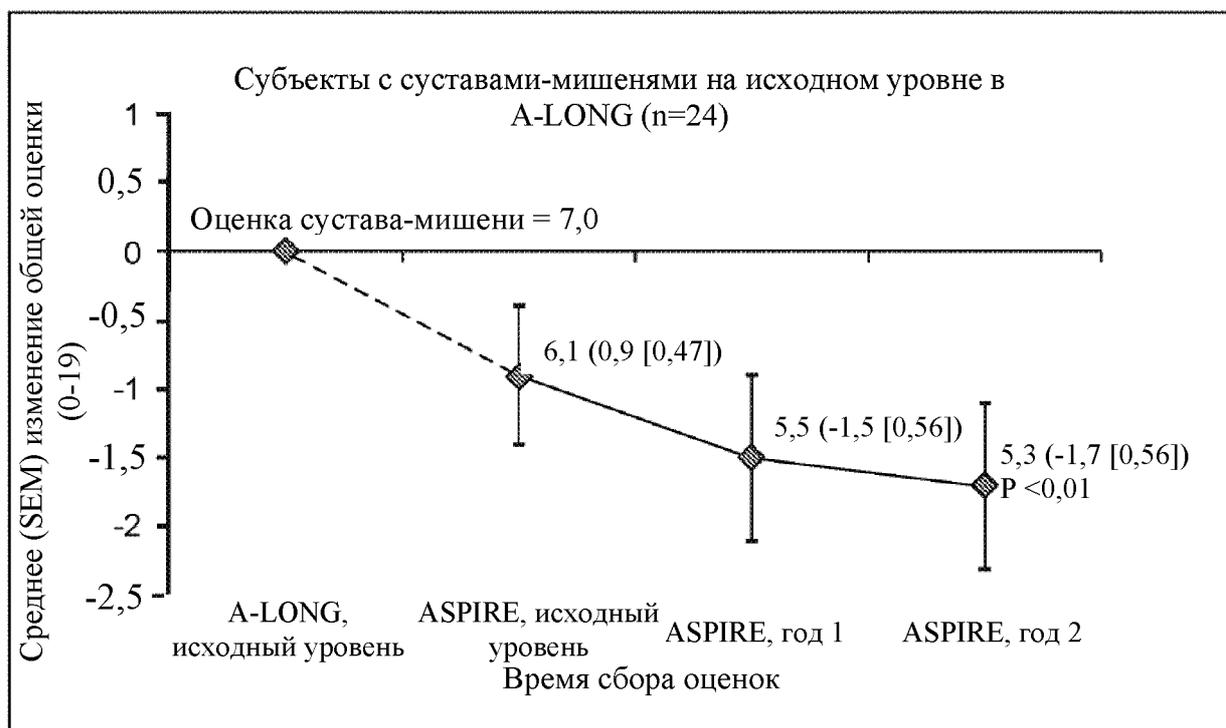
Фиг. 3С



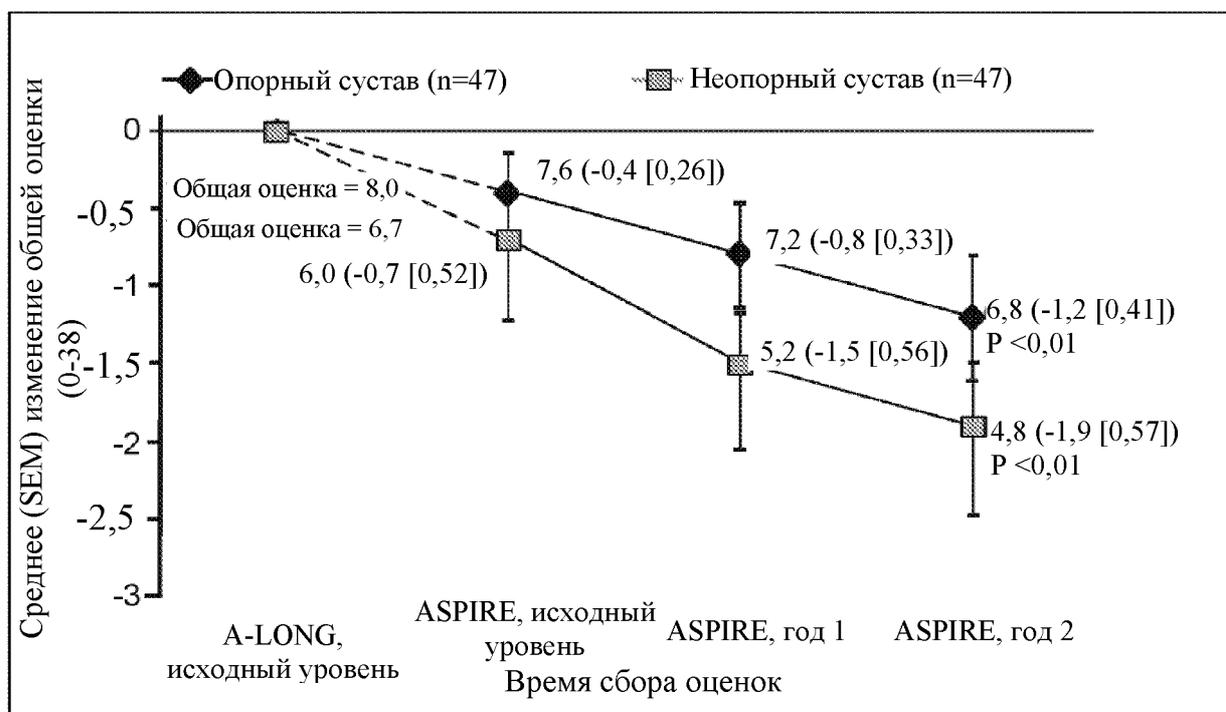
Фиг. 4



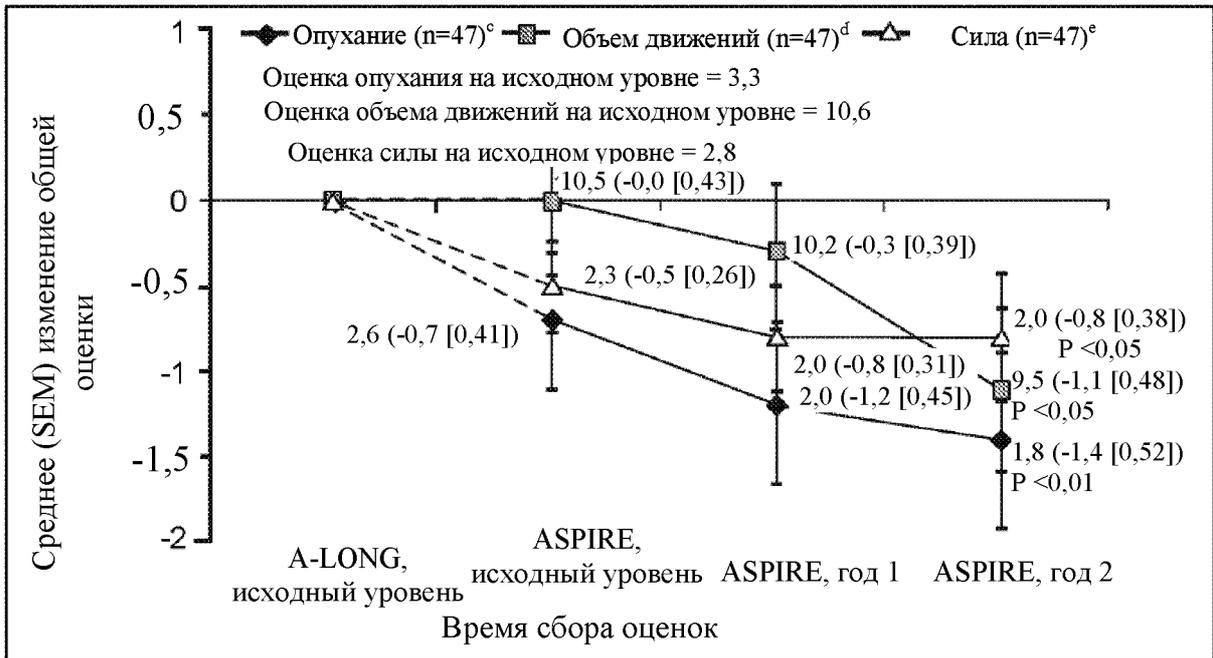
Фиг. 5



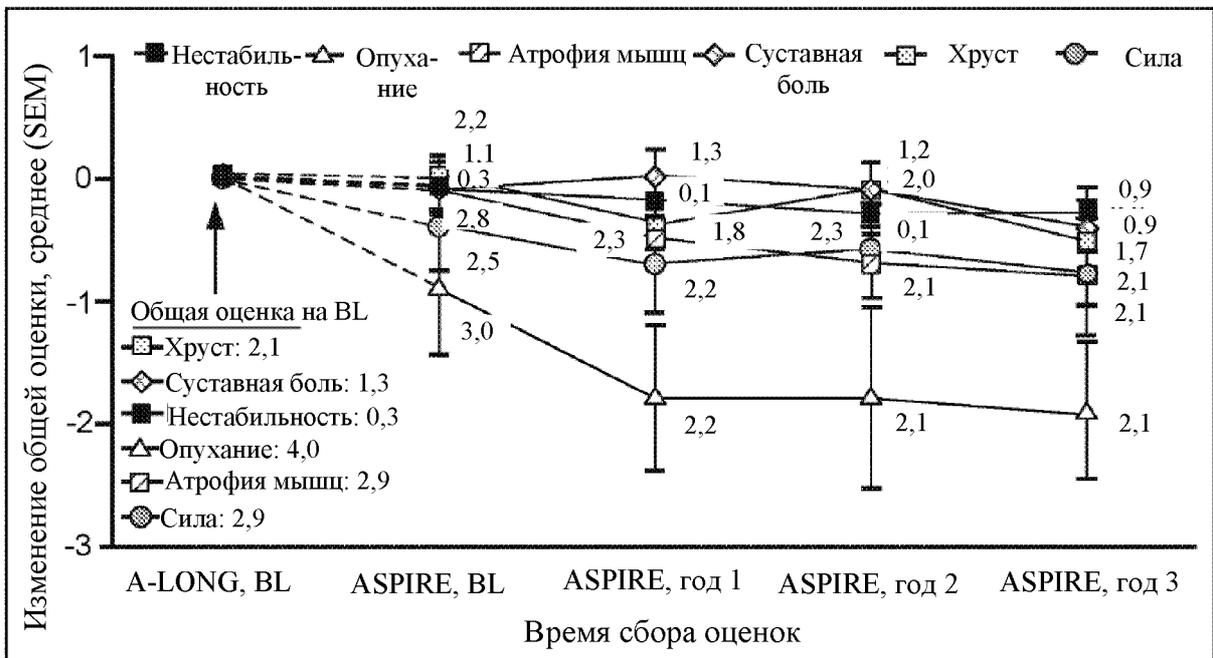
Фиг. 6



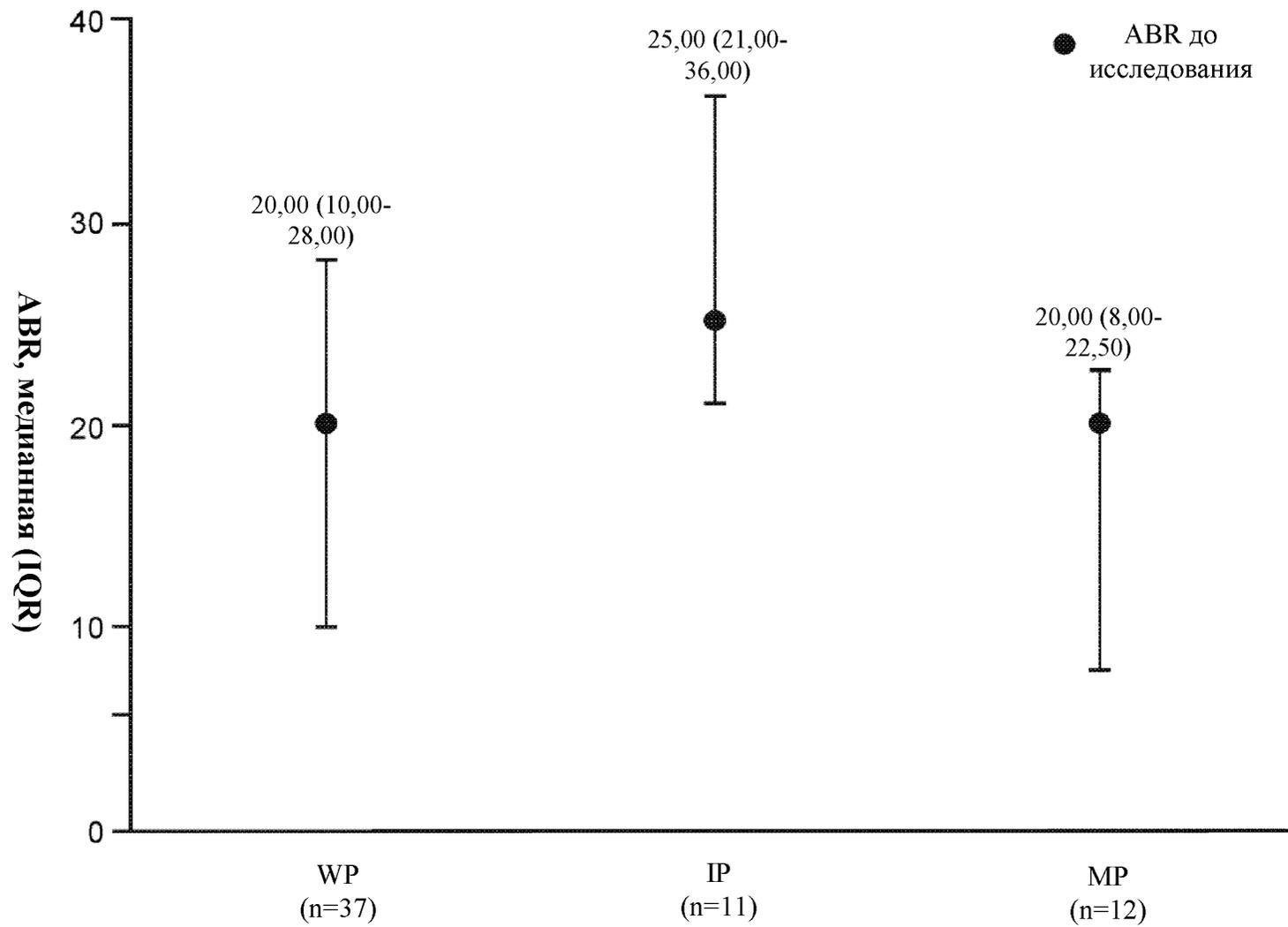
Фиг. 7



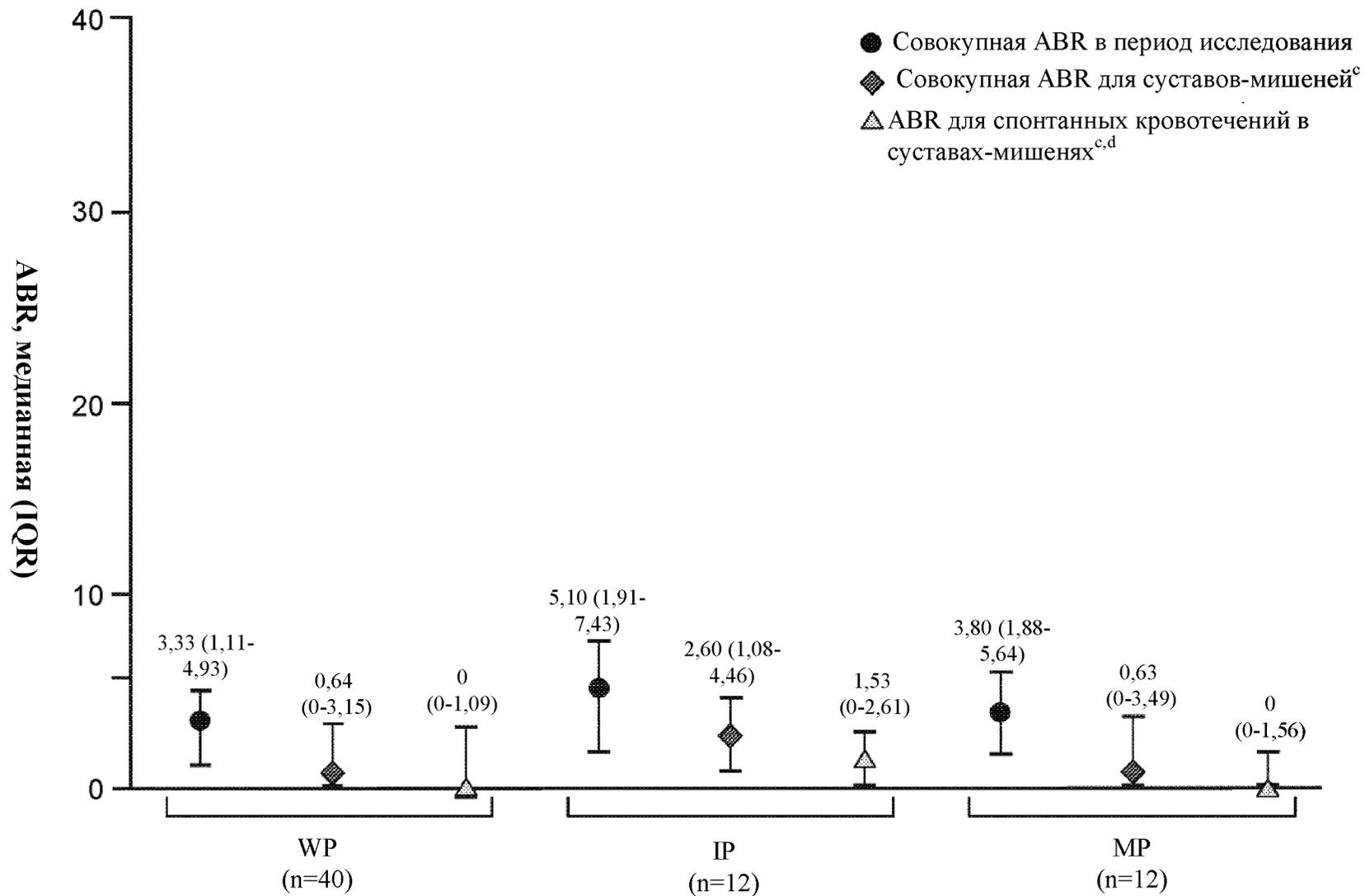
Фиг. 8



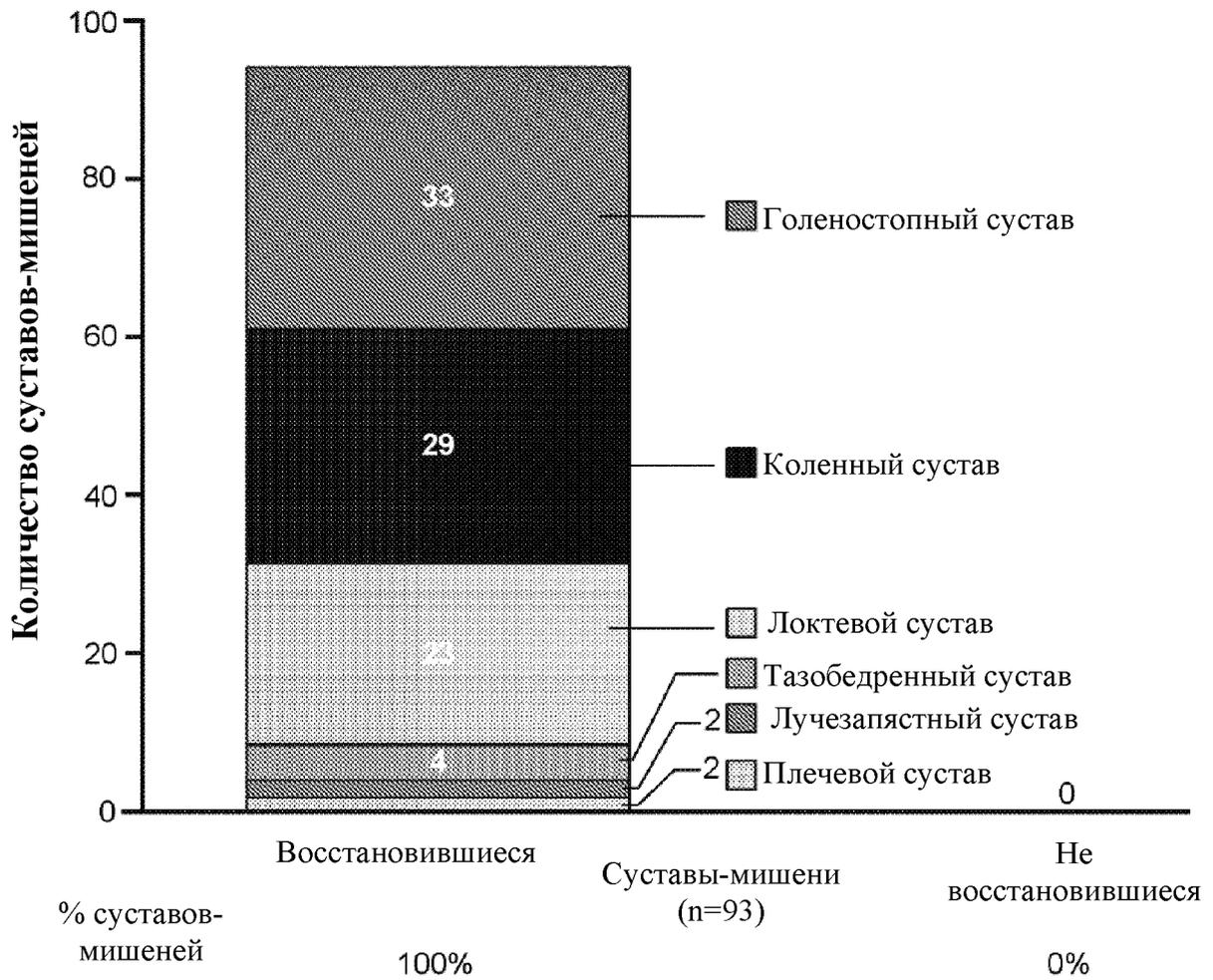
Фиг. 9



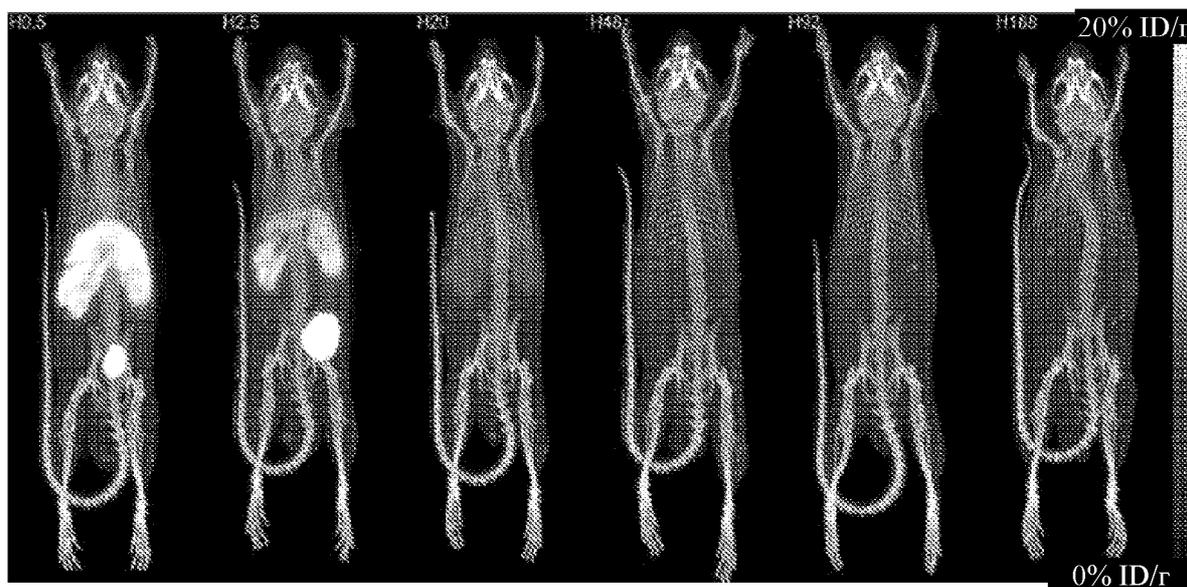
Фиг. 10А



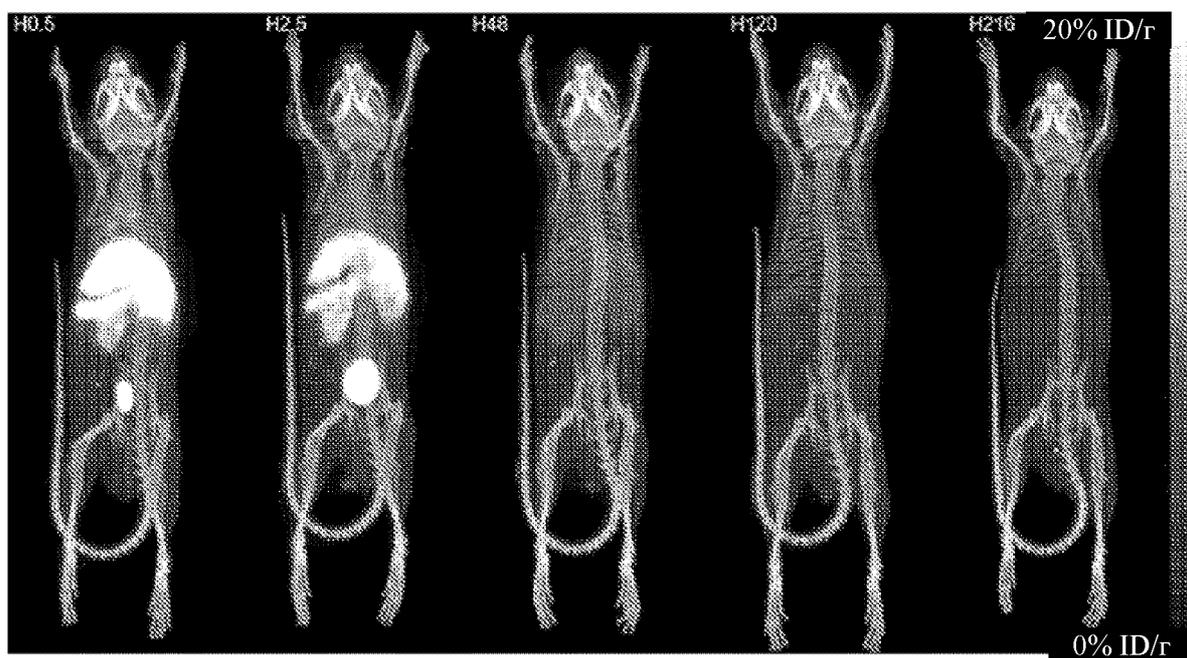
Фиг. 10В



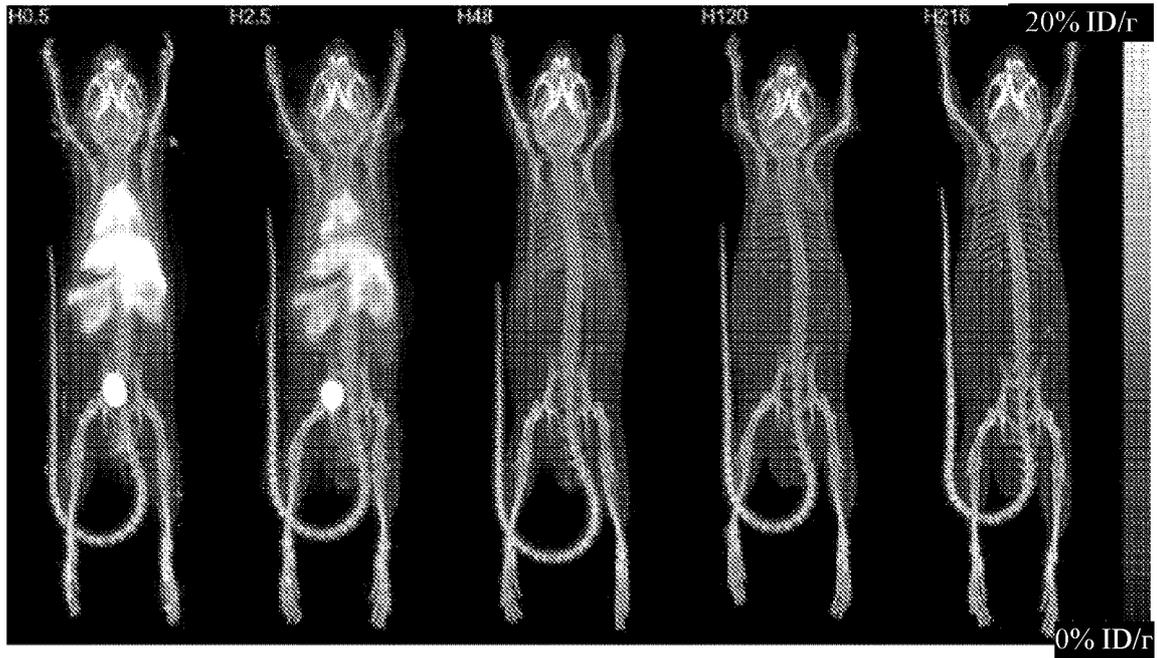
Фиг. 11



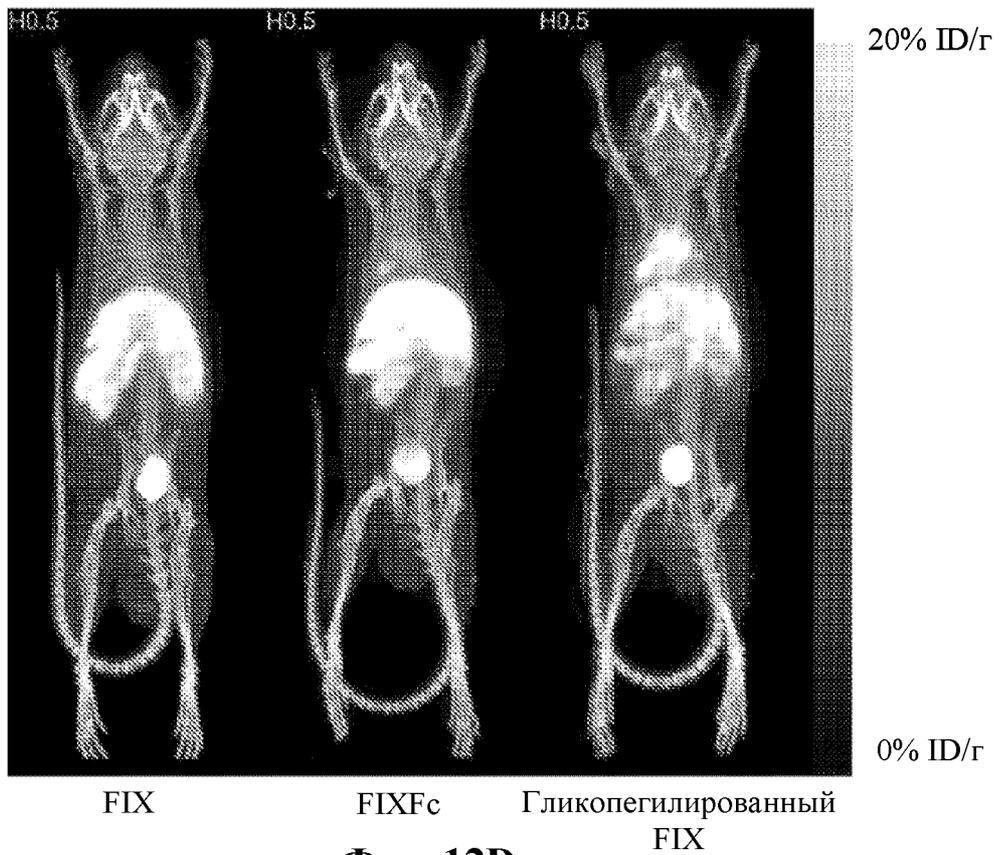
Фиг. 12А



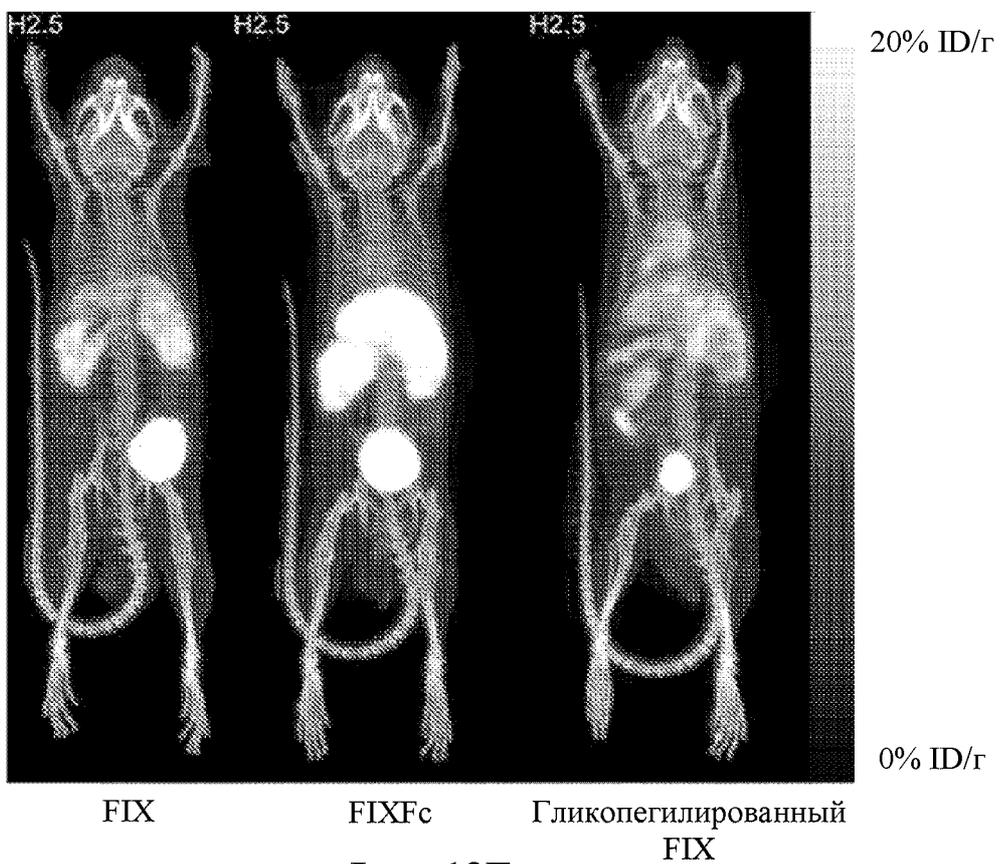
Фиг. 12В



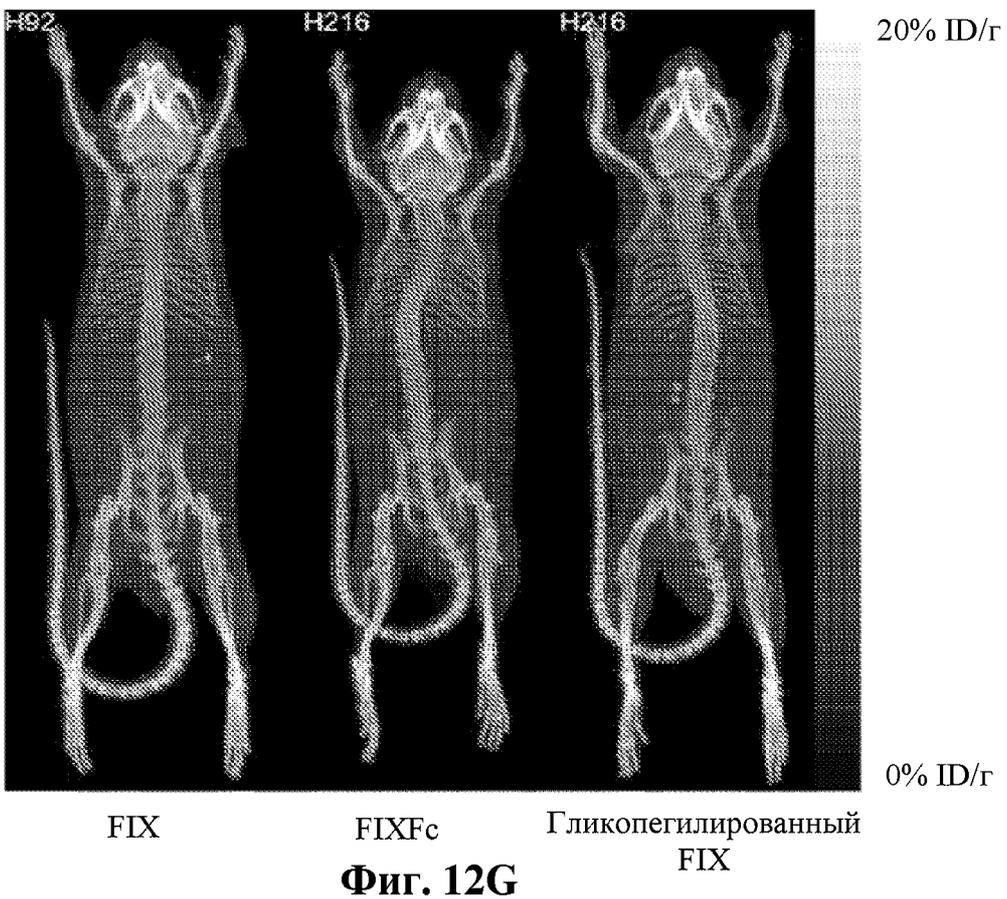
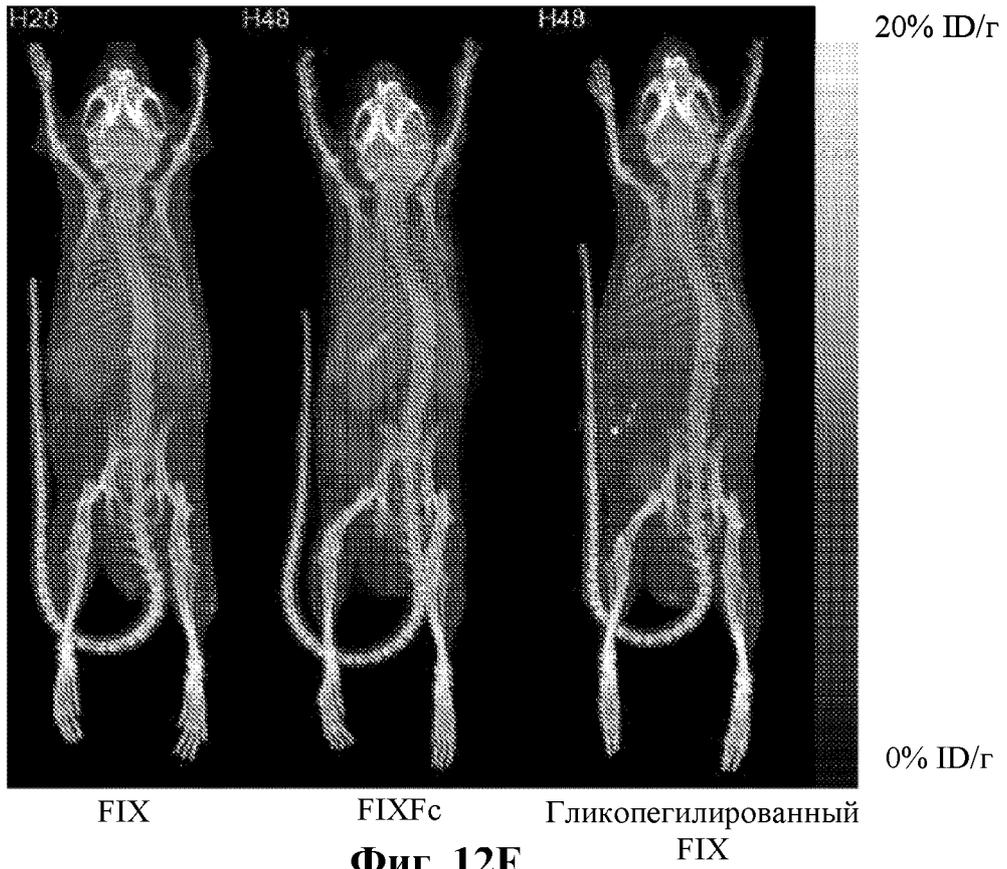
Фиг. 12С



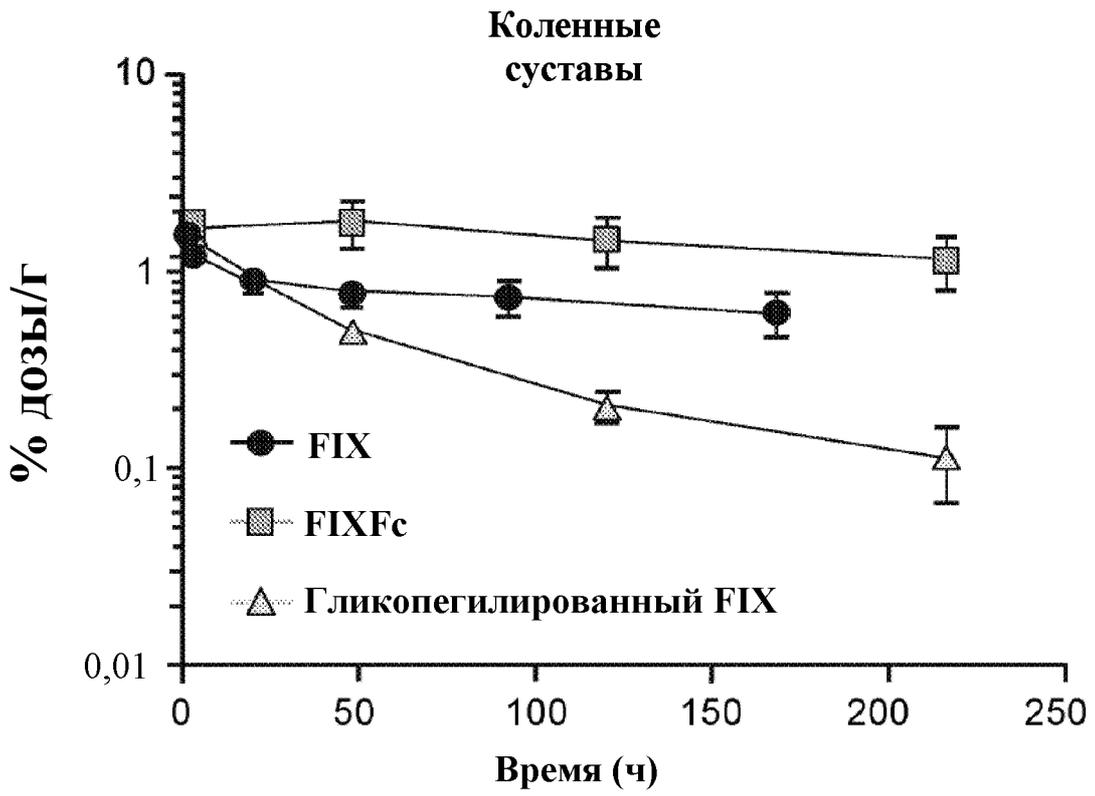
Фиг. 12D



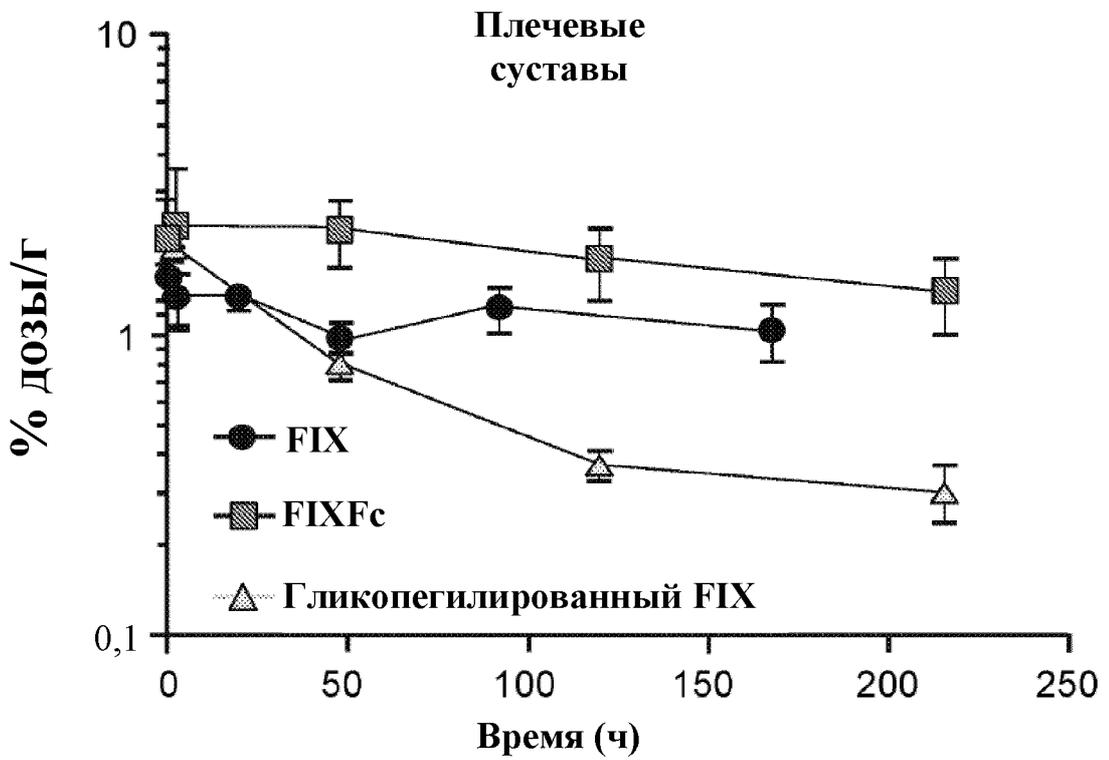
Фиг. 12E



16/35

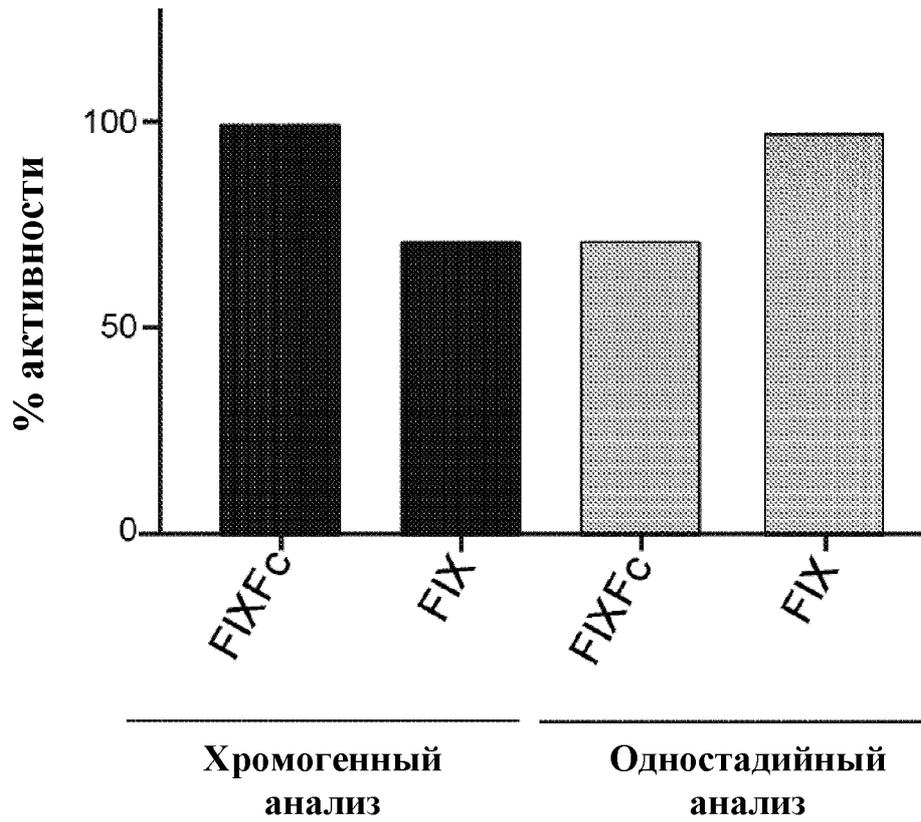


Фиг. 13А

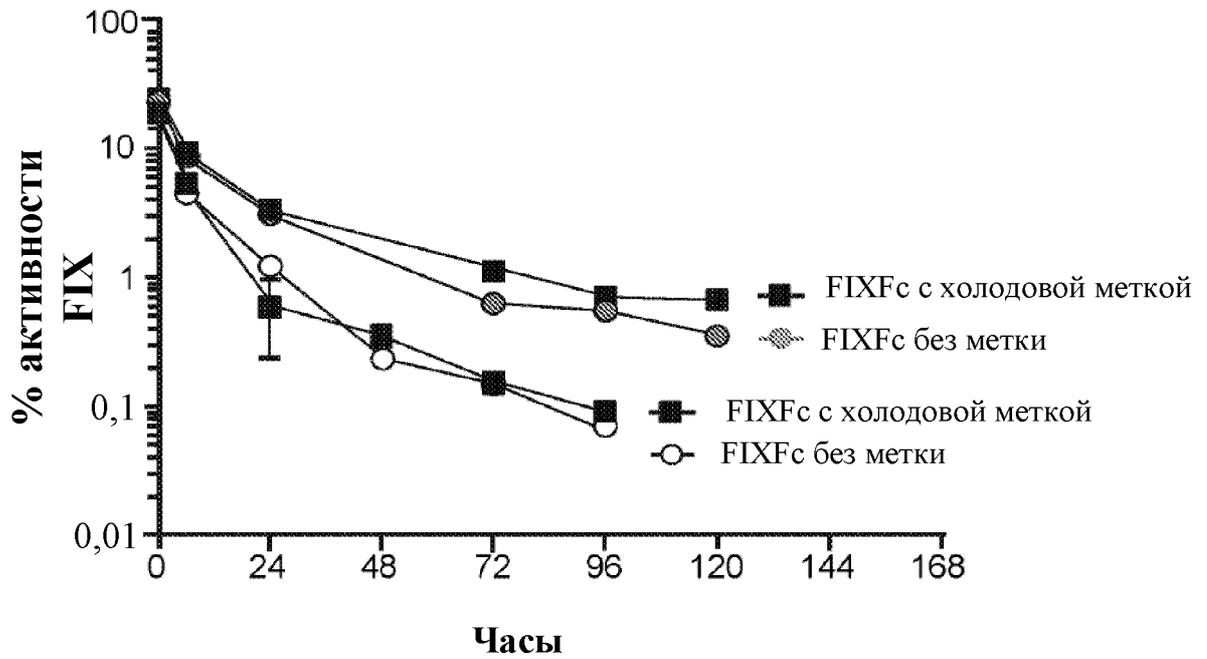


Фиг. 13В

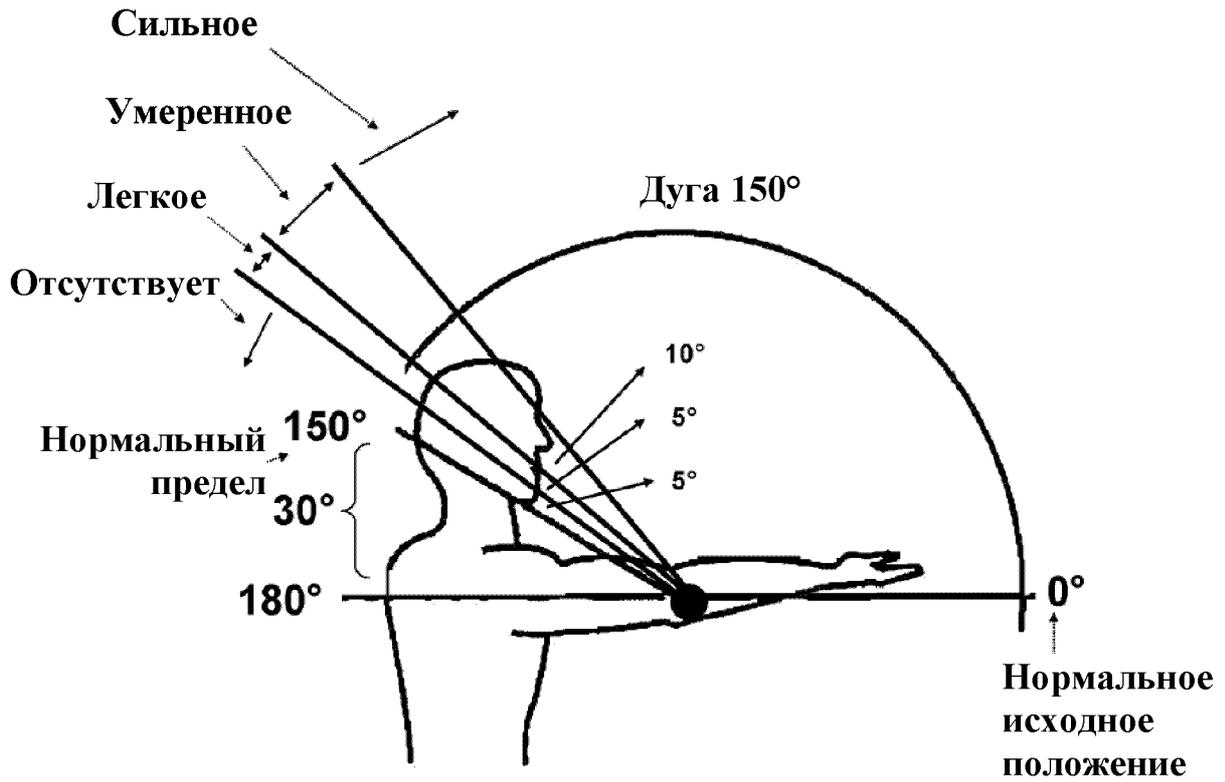
17/35



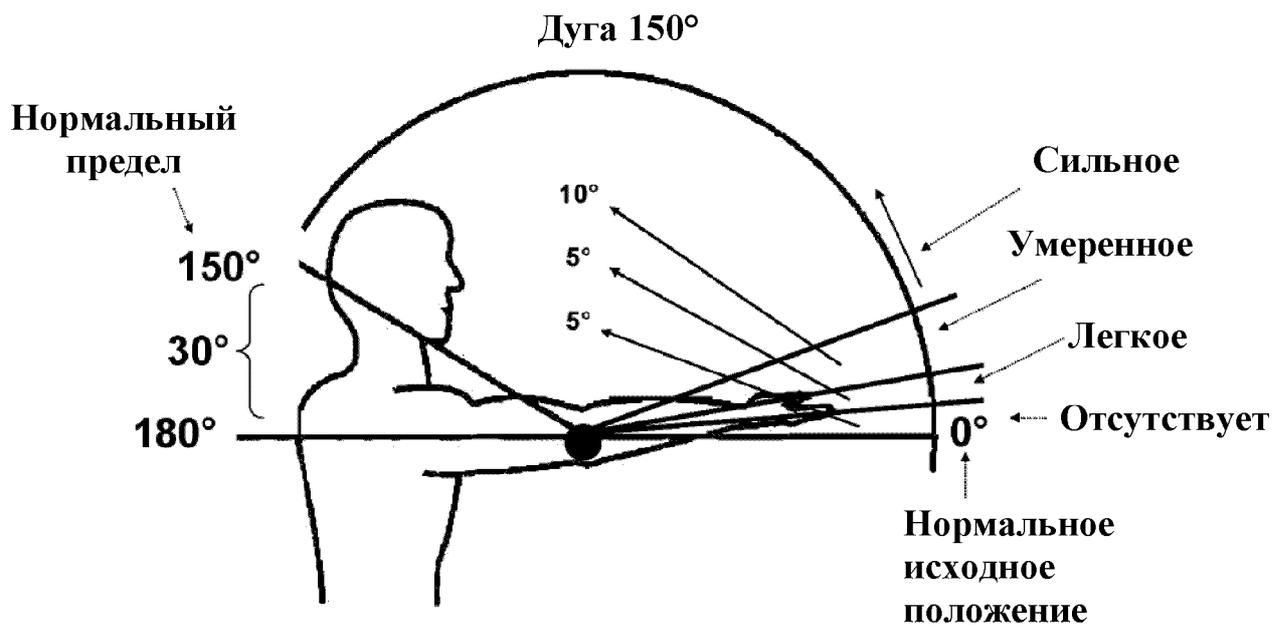
Фиг. 14А



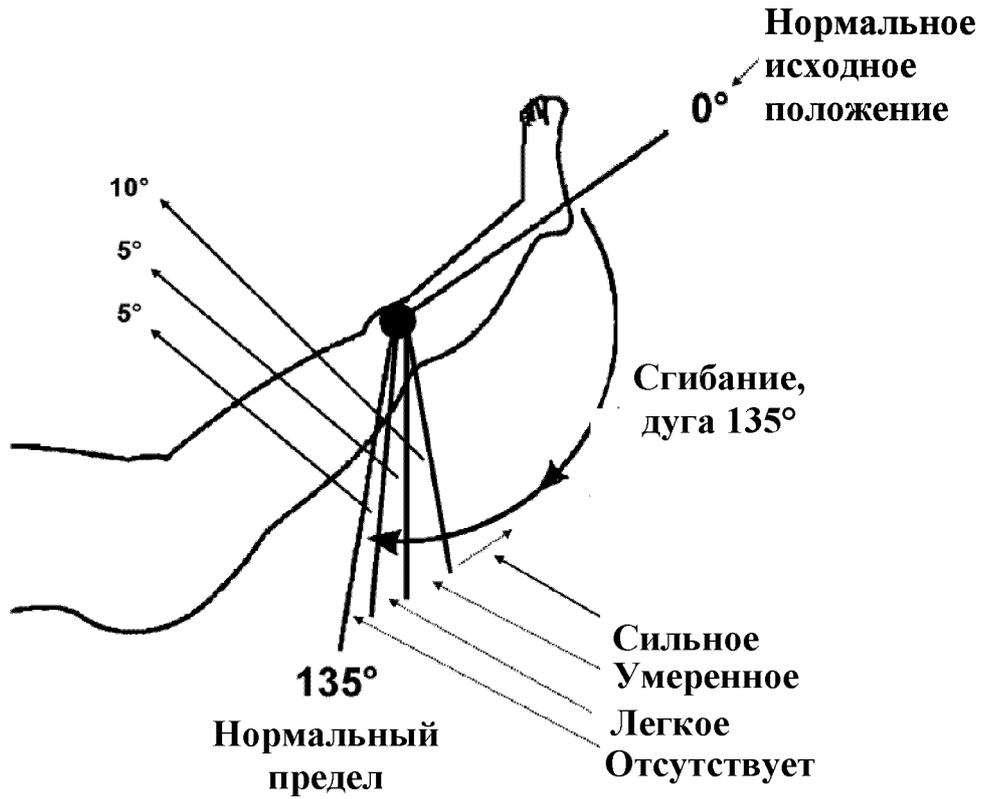
Фиг. 14В



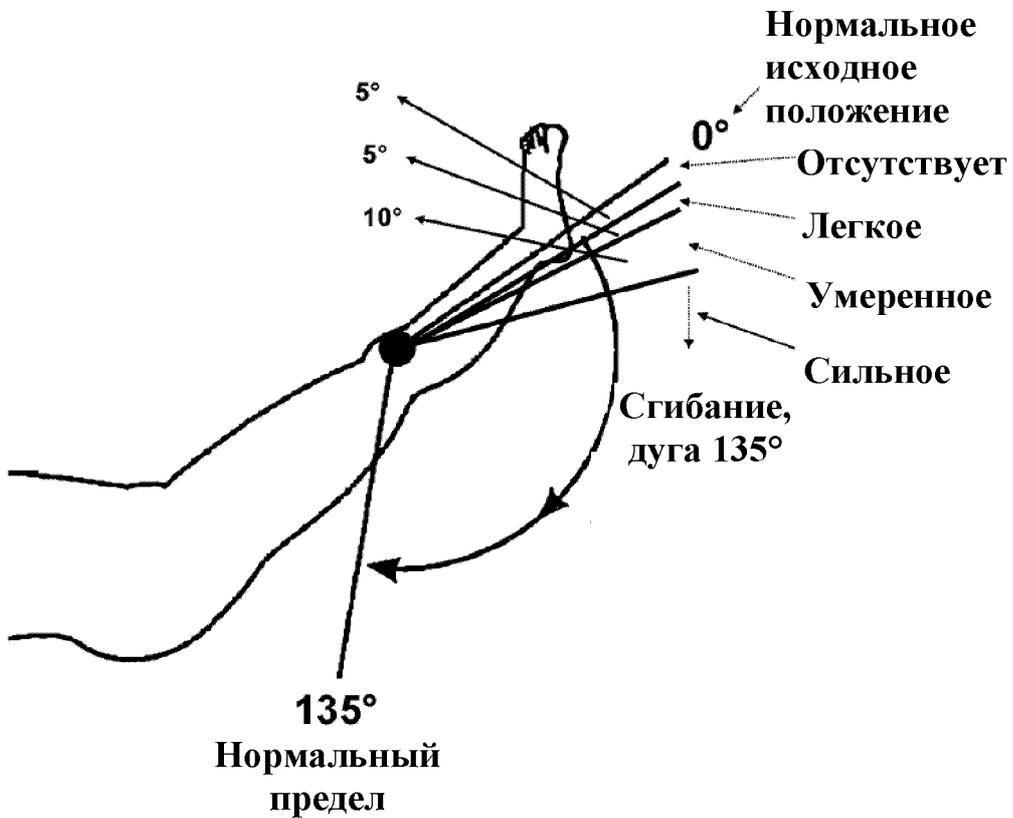
Фиг. 15А



Фиг. 15В

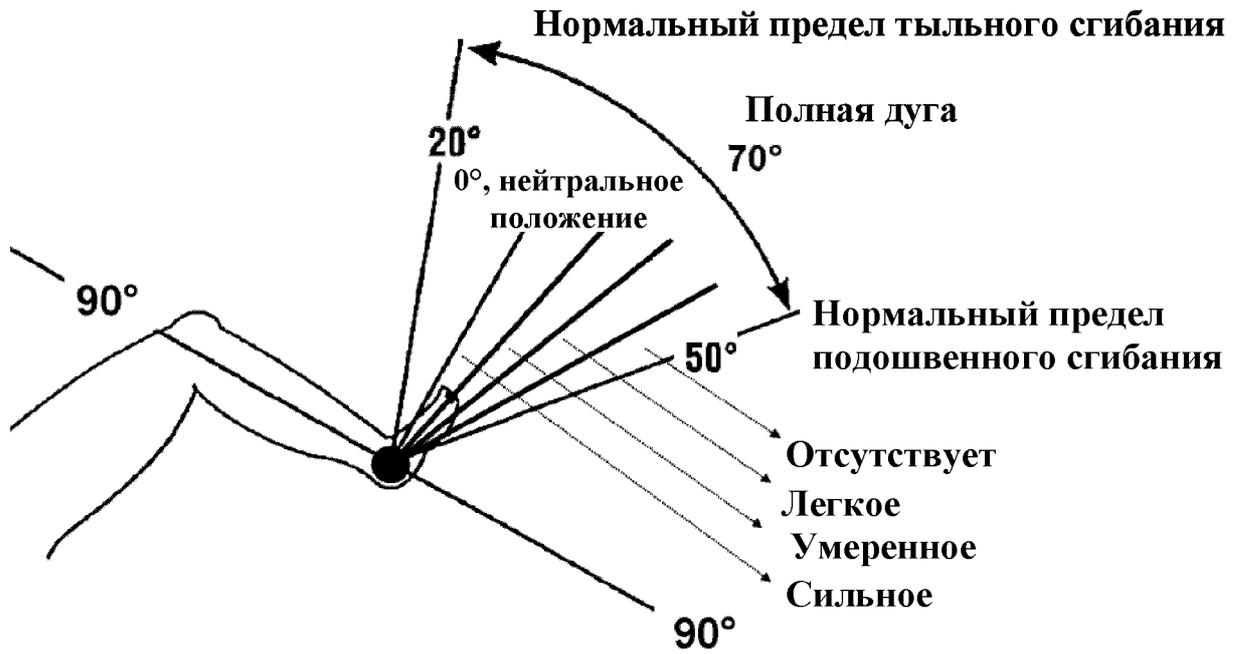


Фиг. 15C

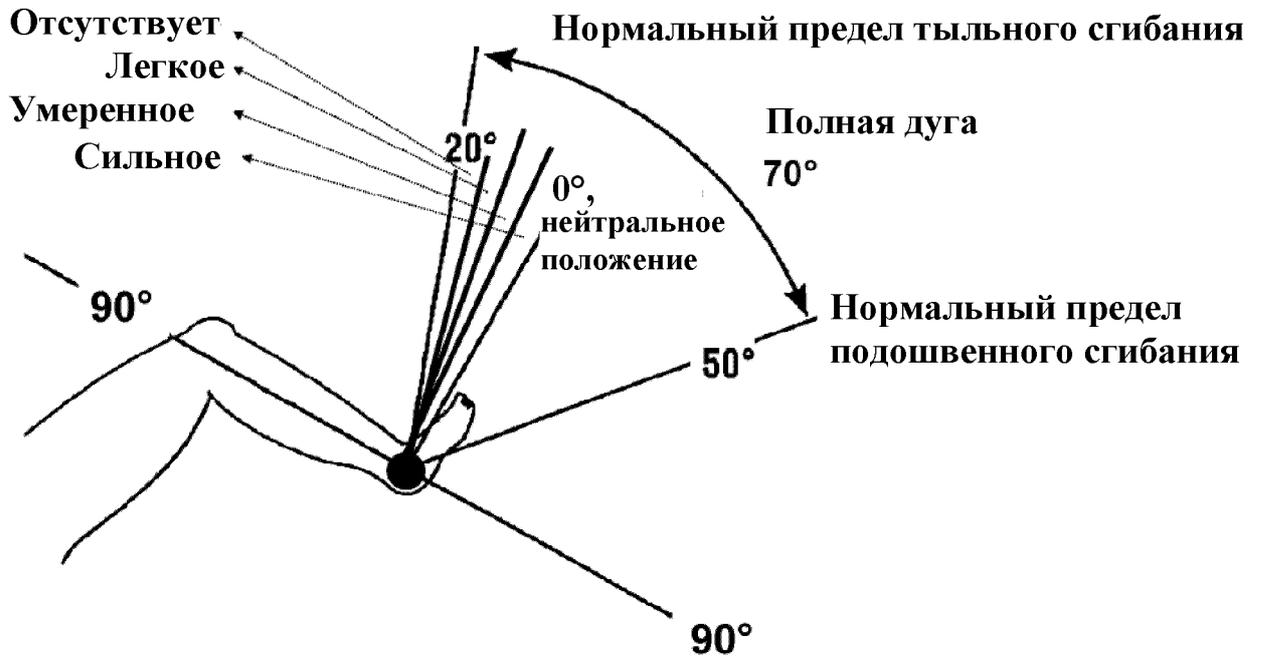


Фиг. 15D

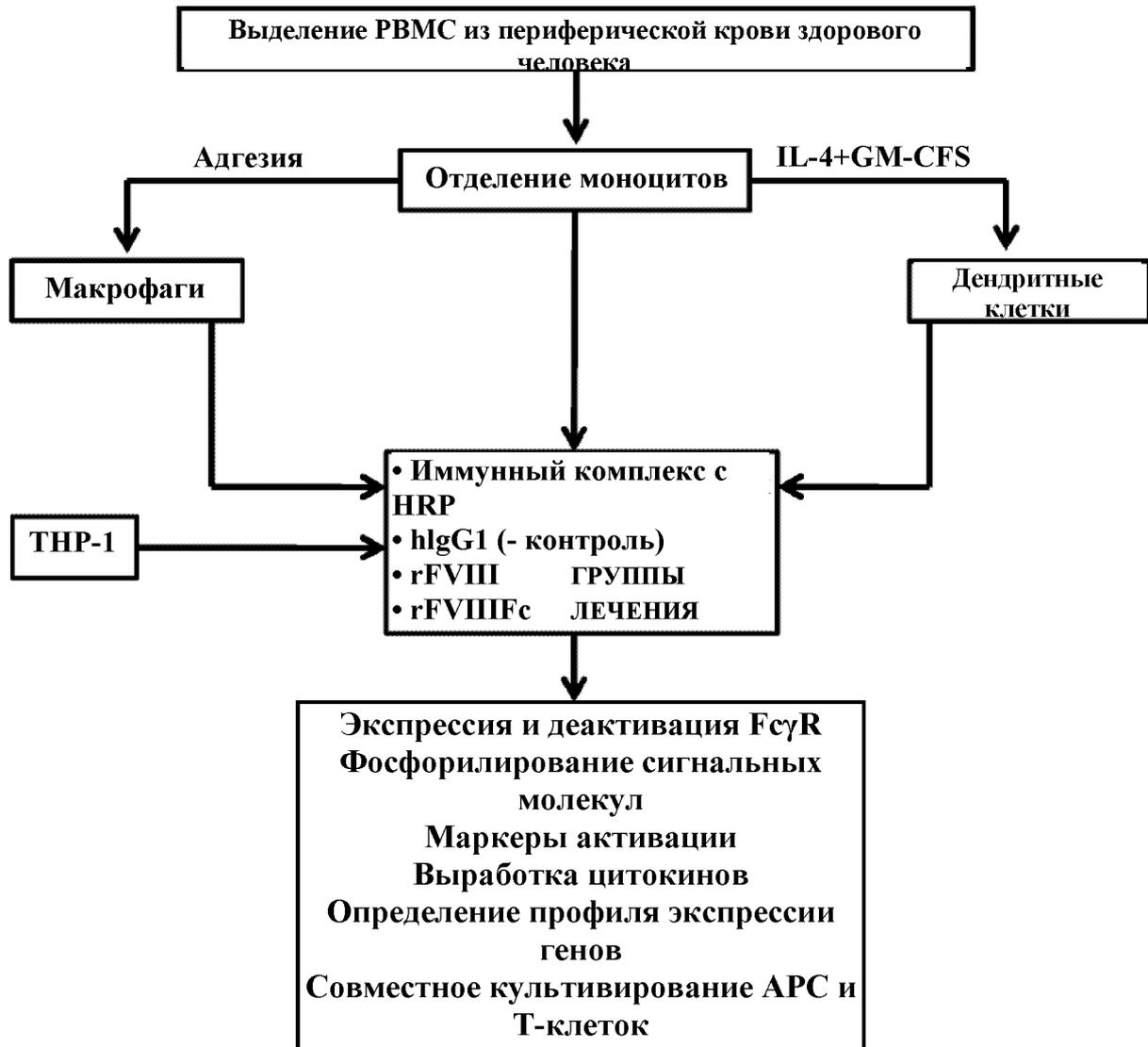
20/35



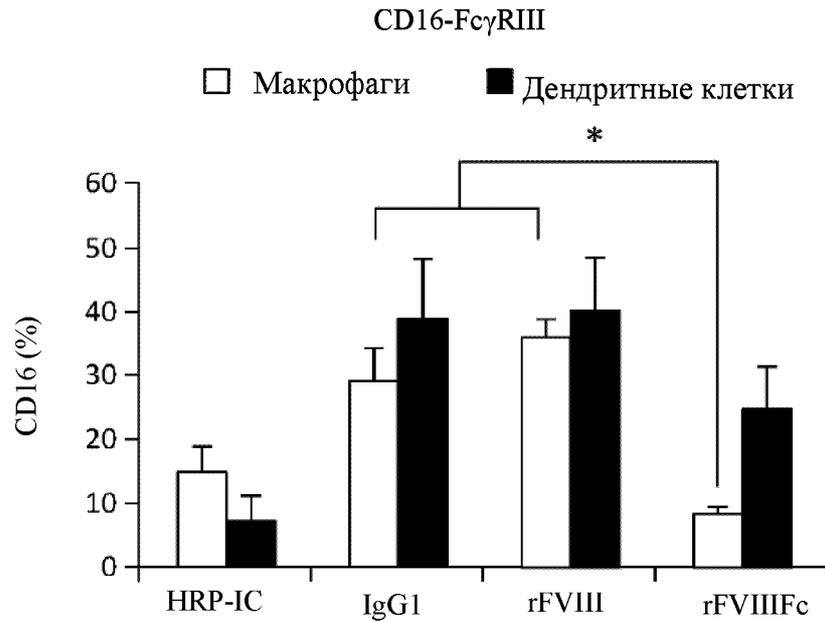
Фиг. 15E



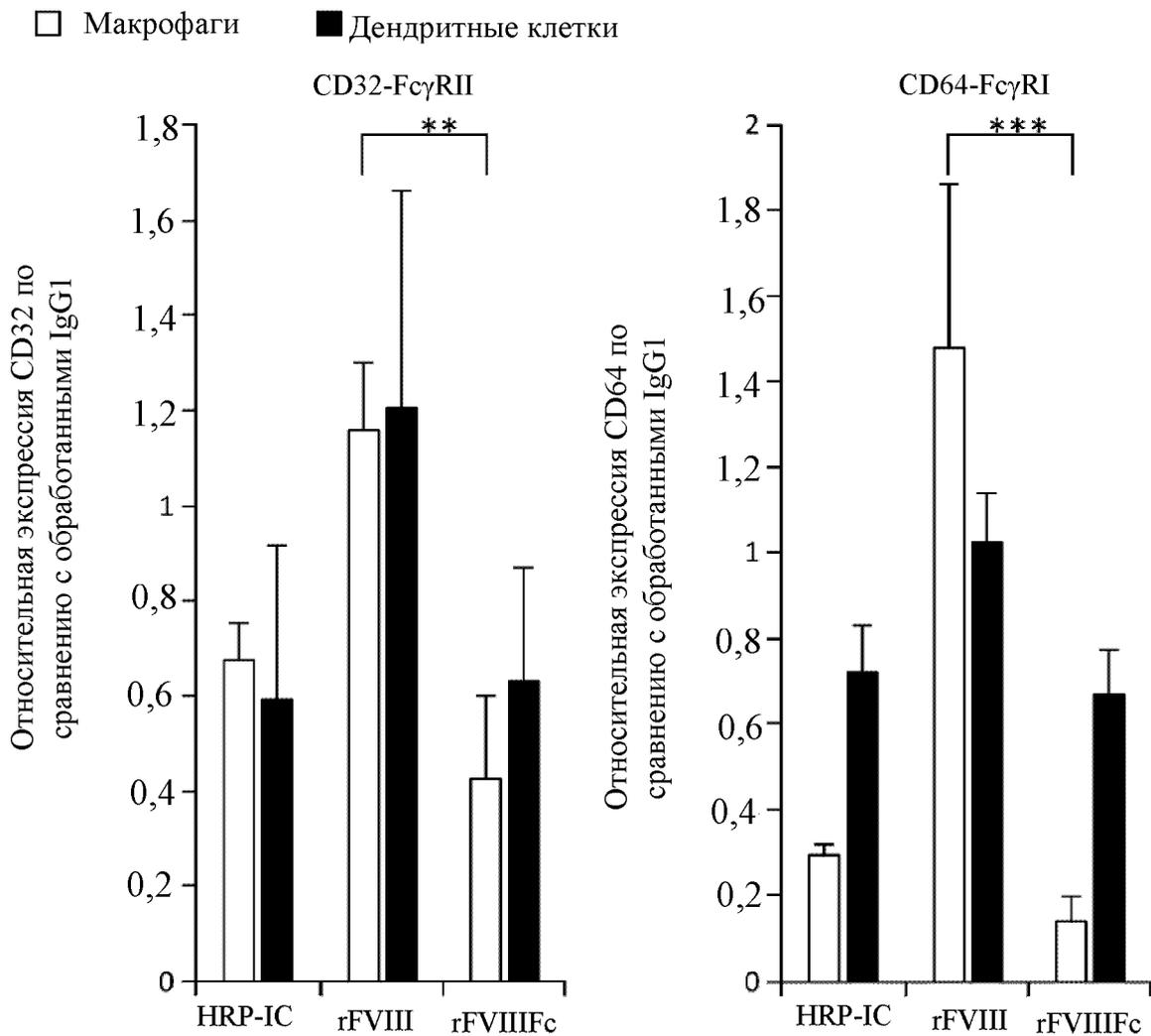
Фиг. 15F



Фиг. 16

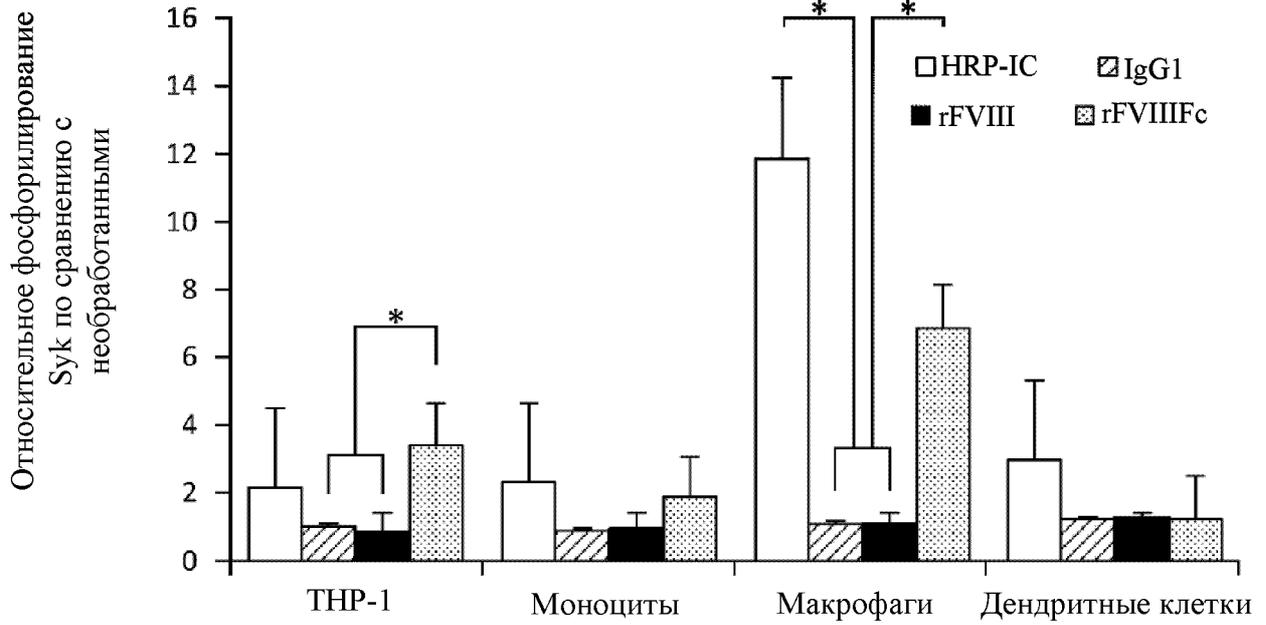


Фиг. 17А

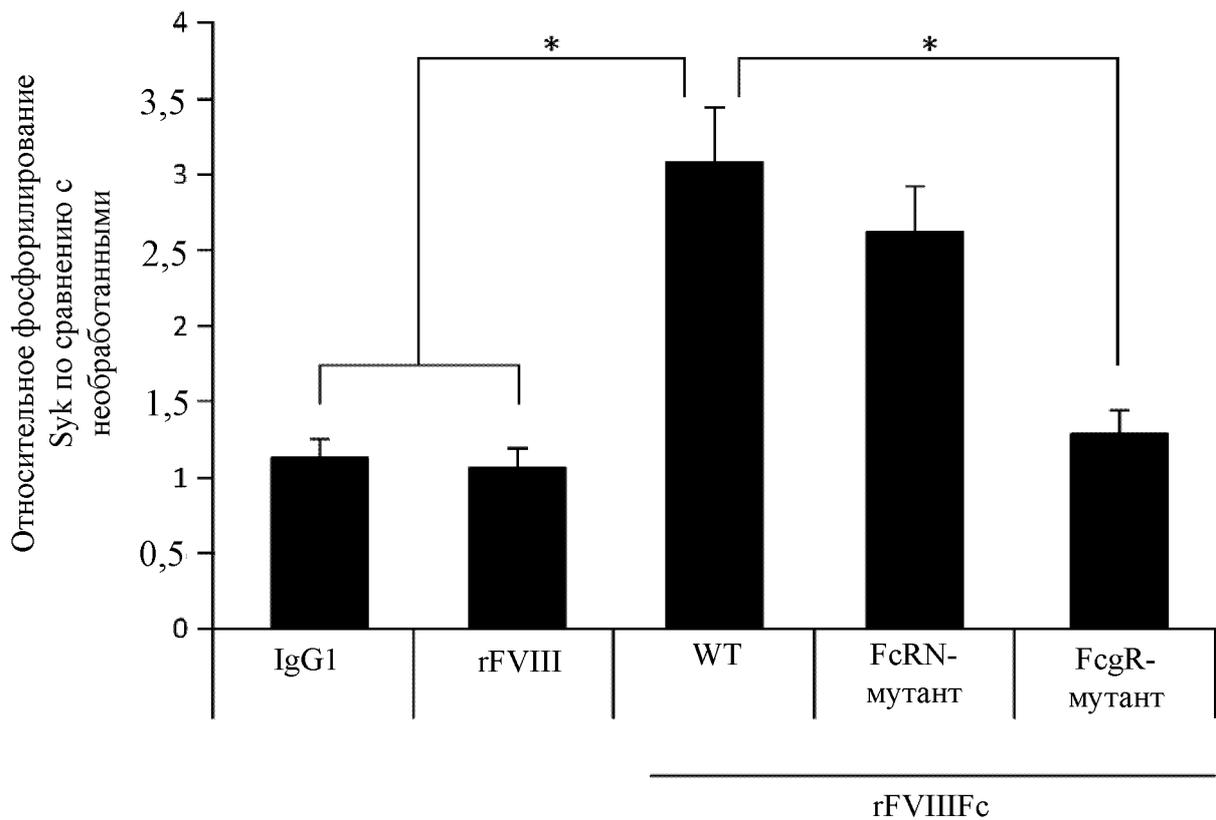


Фиг. 17В

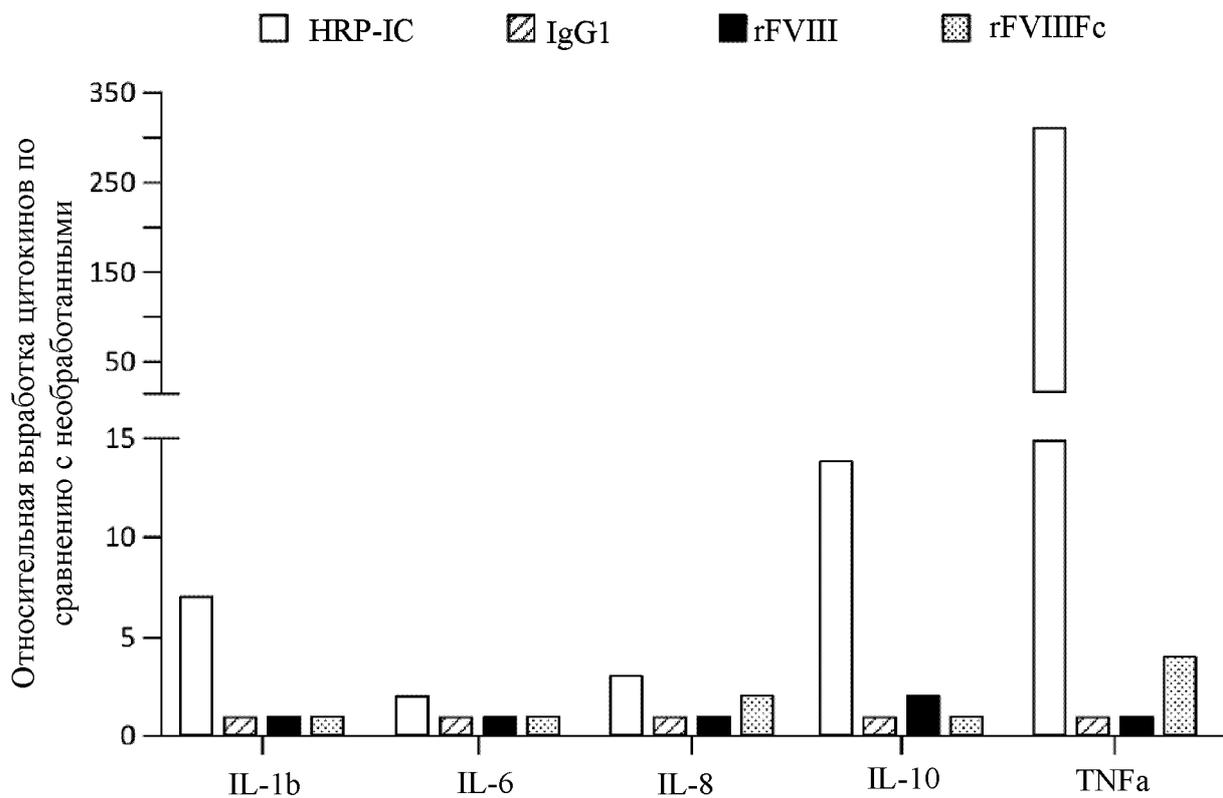
Фиг. 17С



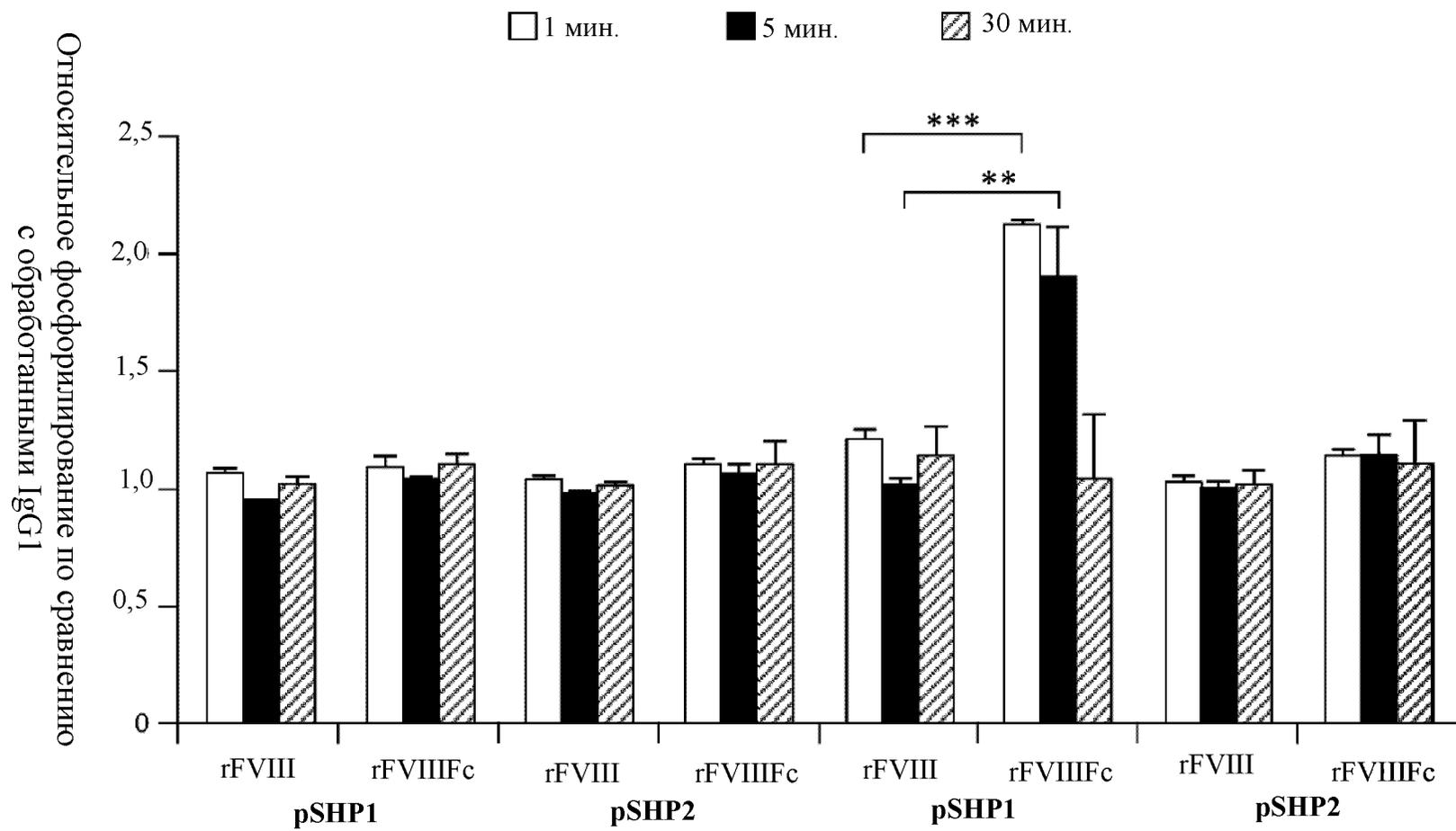
Фиг. 18А



Фиг. 18В



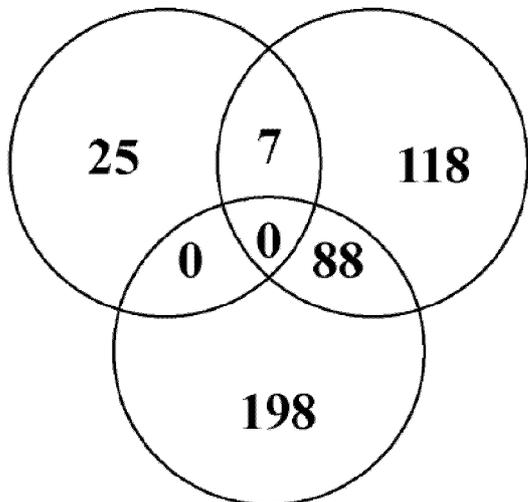
Фиг. 18С



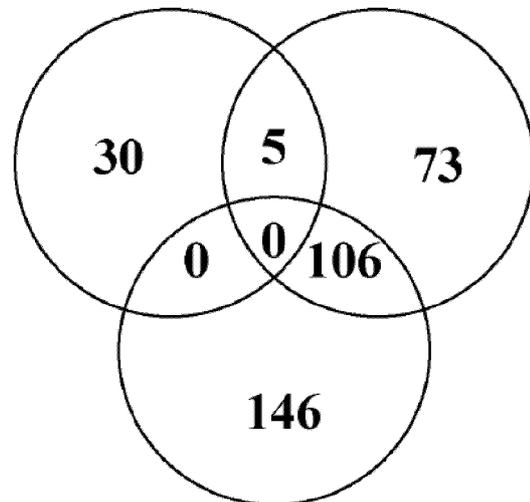
25/35

Фиг. 19

FVIII в сравнении с IgG **FVIIIFc в сравнении с IgG** **FVIII в сравнении с IgG** **FVIIIFc в сравнении с IgG**



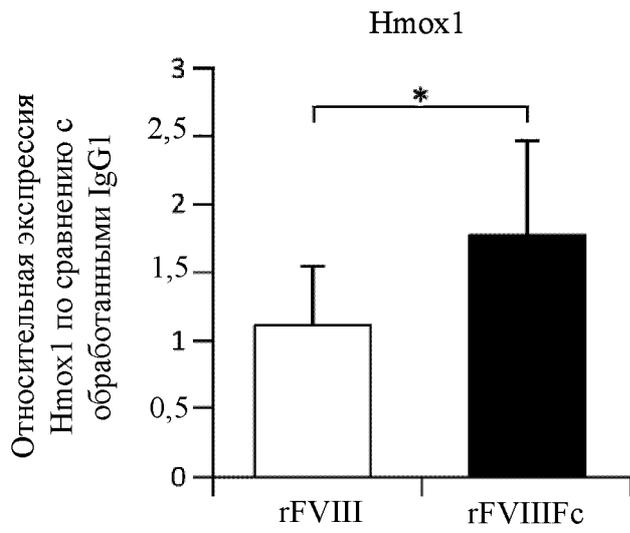
FVIII Fc в сравнении с FVIII



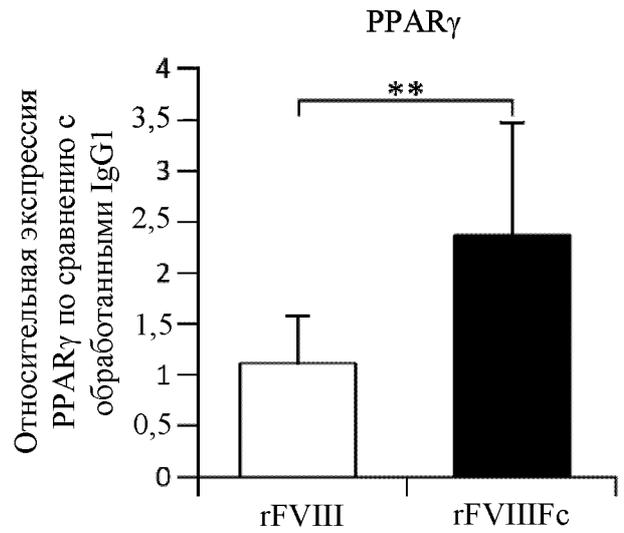
FVIII Fc в сравнении с FVIII

Фиг. 20А

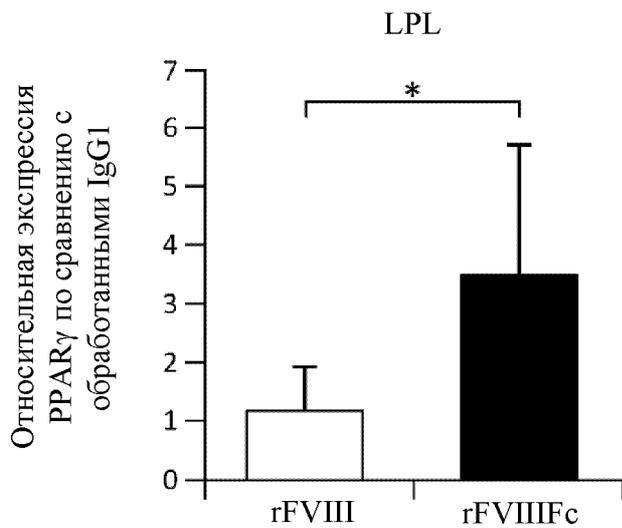
Фиг. 20В



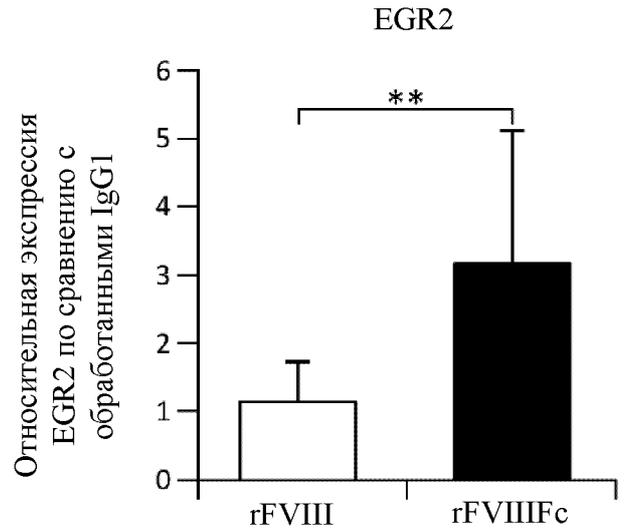
Фиг. 20С



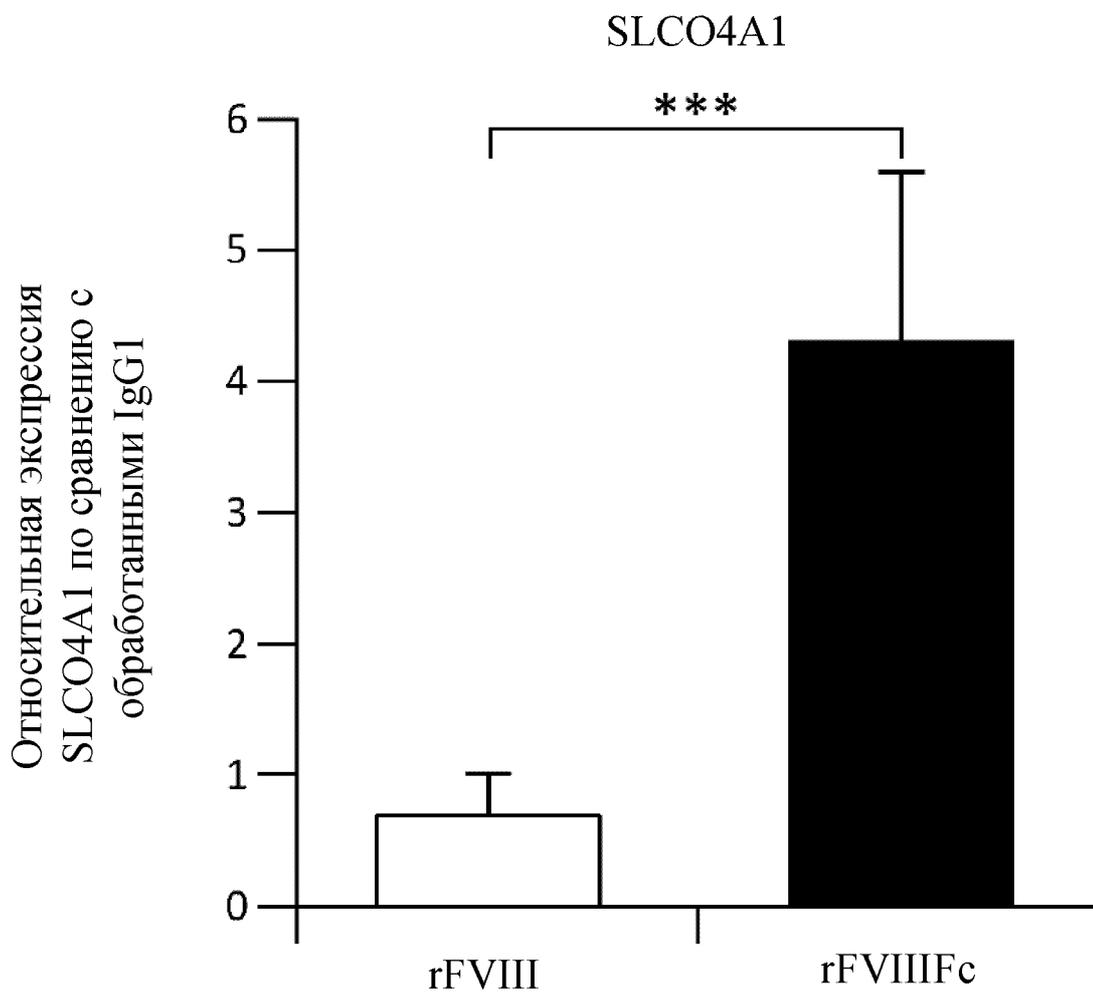
Фиг. 20D



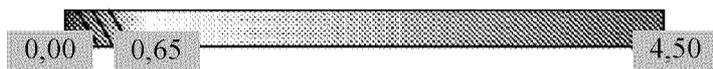
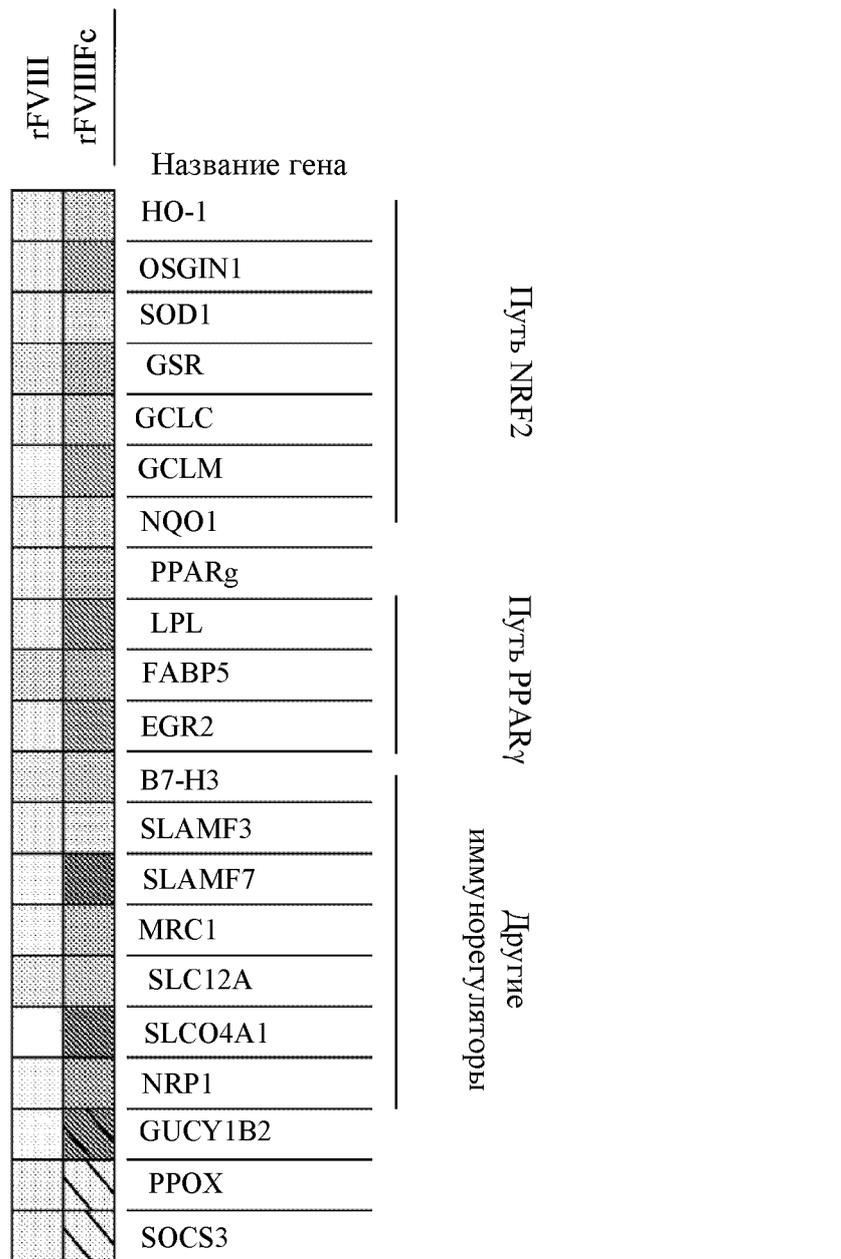
Фиг. 20Е



Фиг. 20F

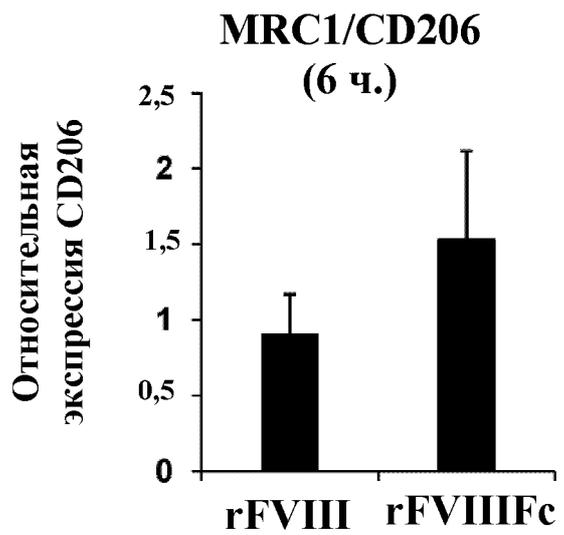


Фиг. 20G

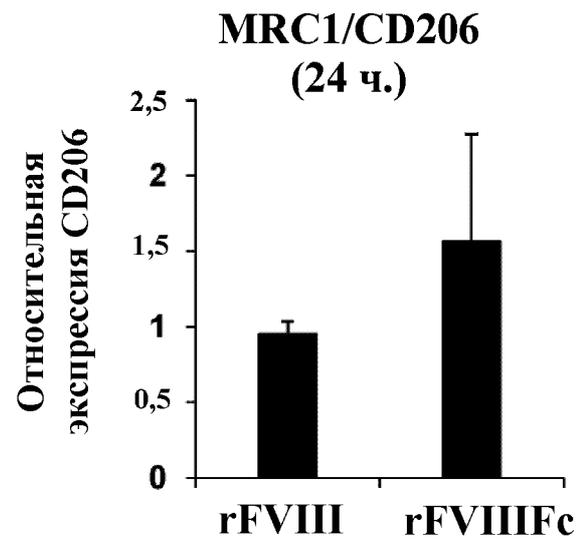


По сравнению с обработанными IgG
6-часовая обработка
n=6-15

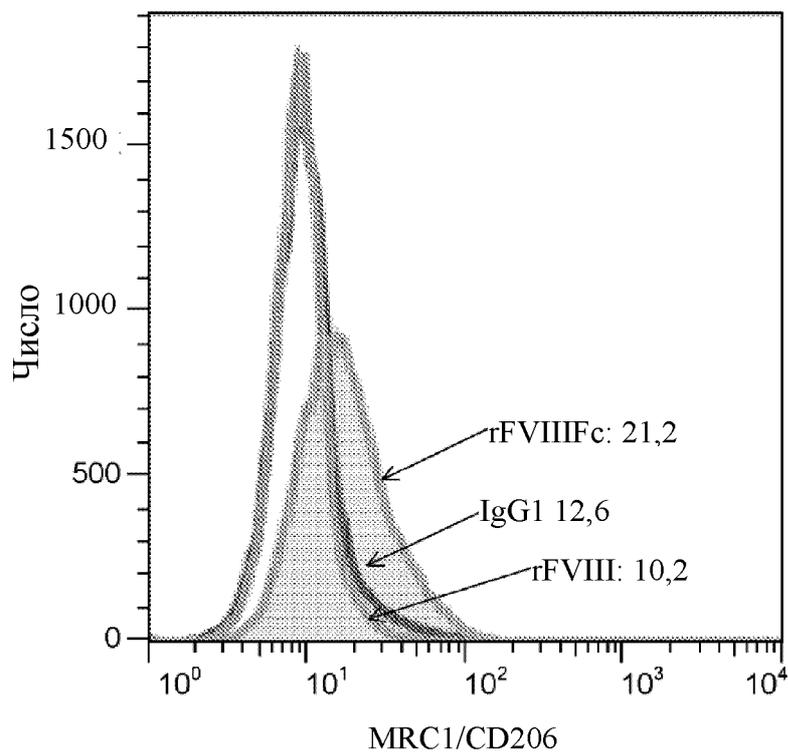
Фиг. 20H



Фиг. 20I



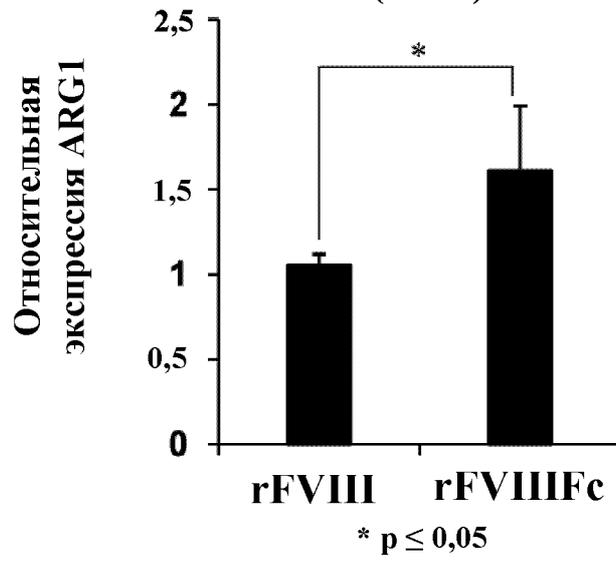
Фиг. 20J



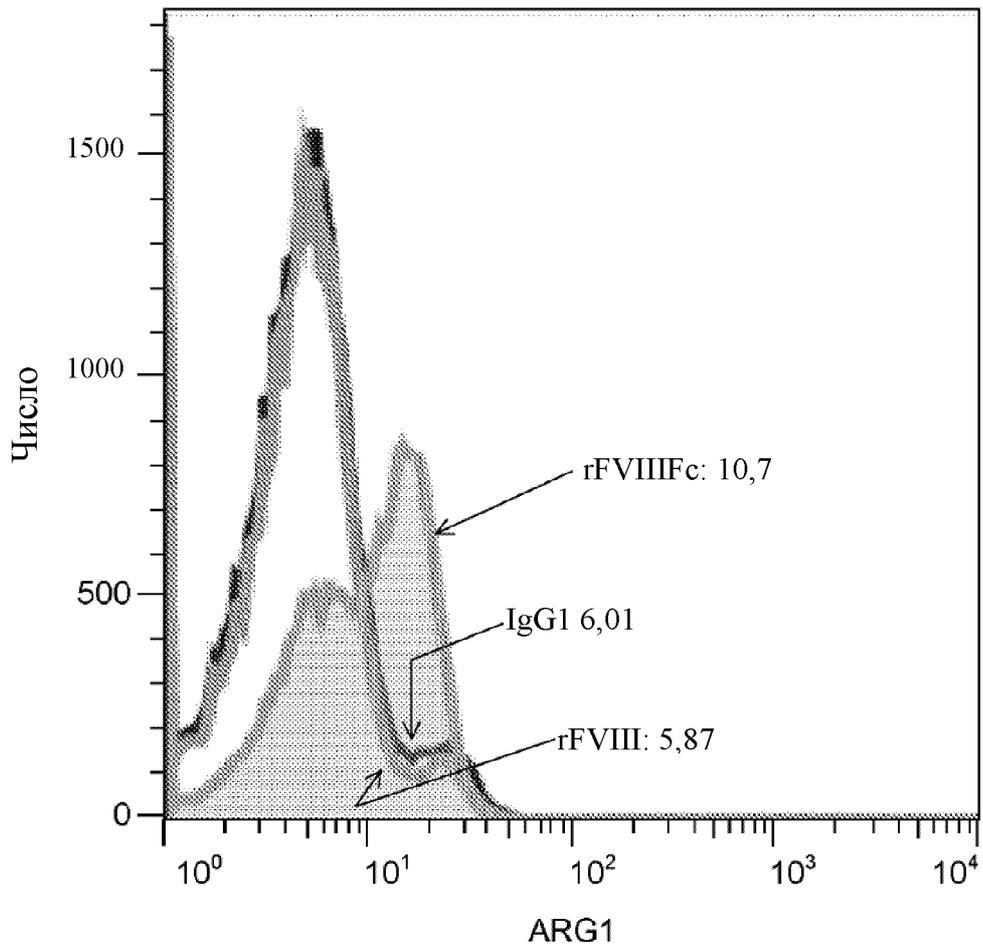
Фиг. 20K

31/35

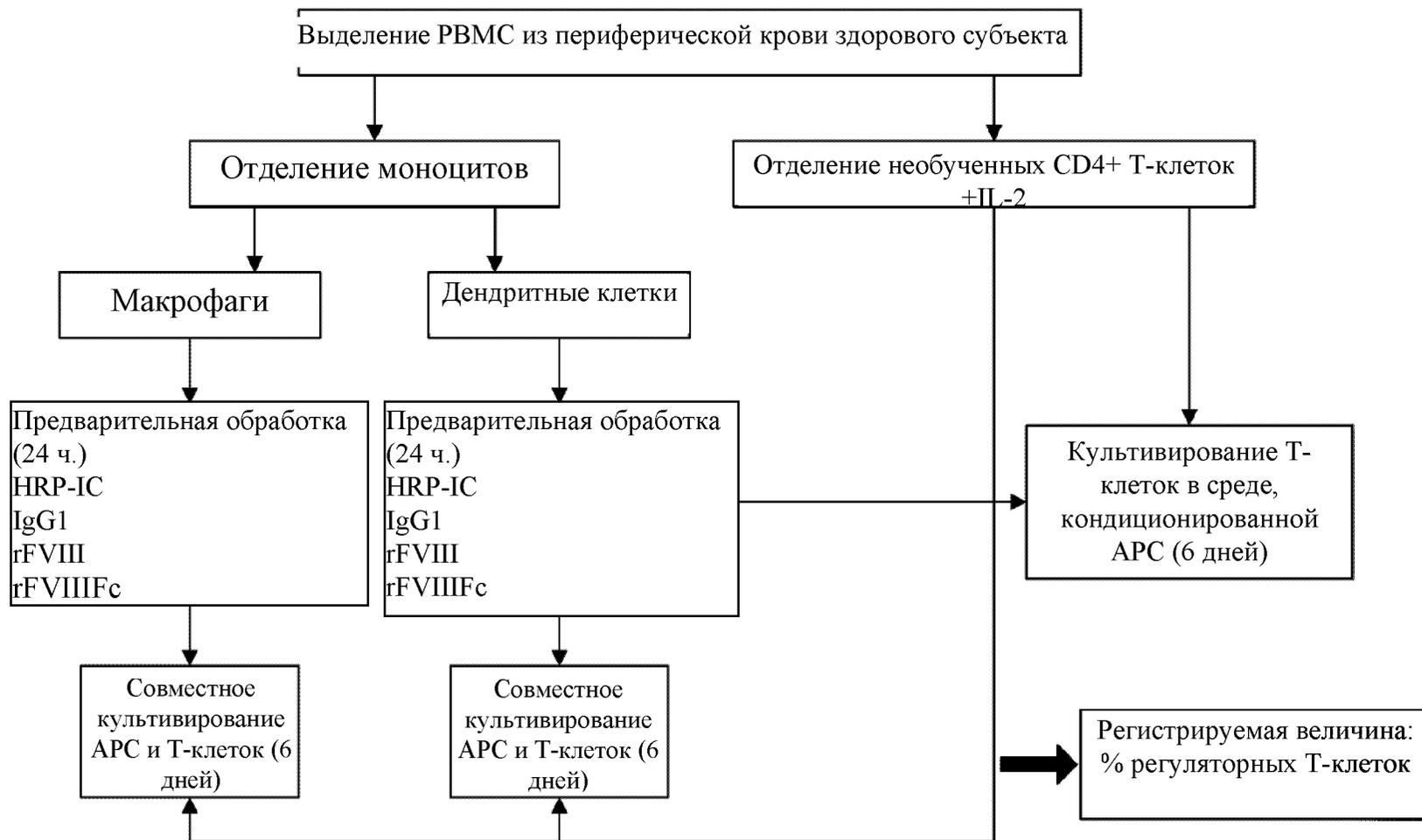
ARG1
(24 ч.)



Фиг. 20L

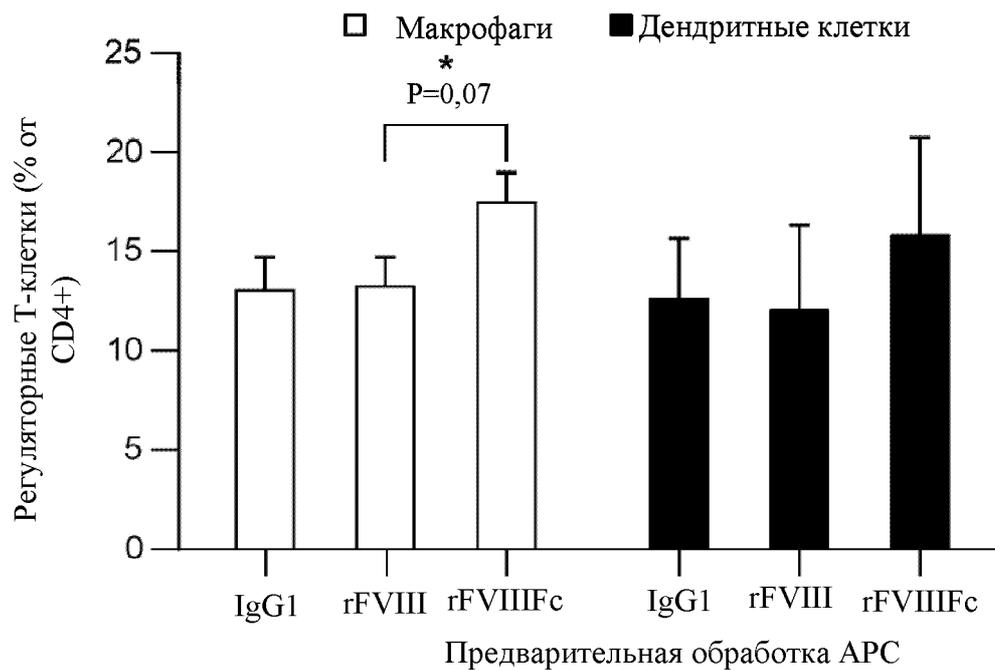


Фиг. 20M

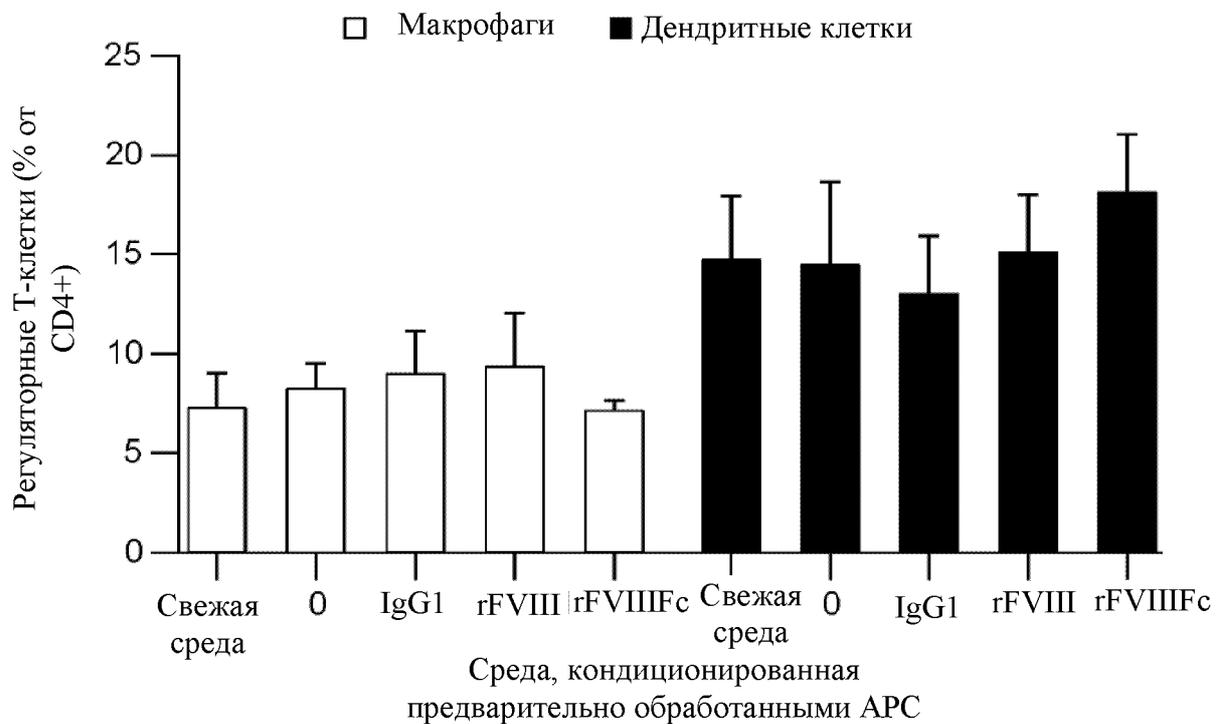


32/35

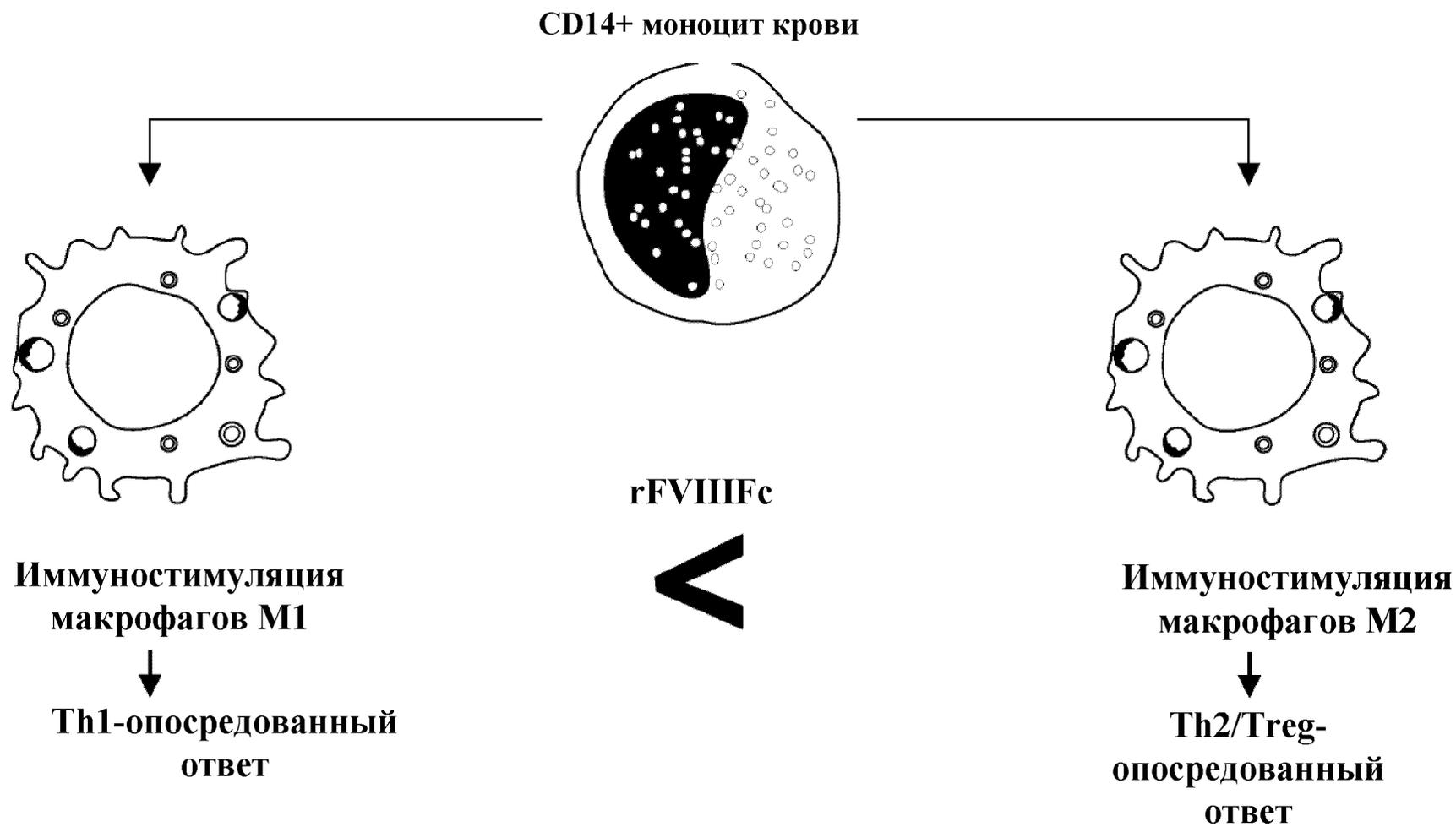
Фиг. 21А



Фиг. 21В

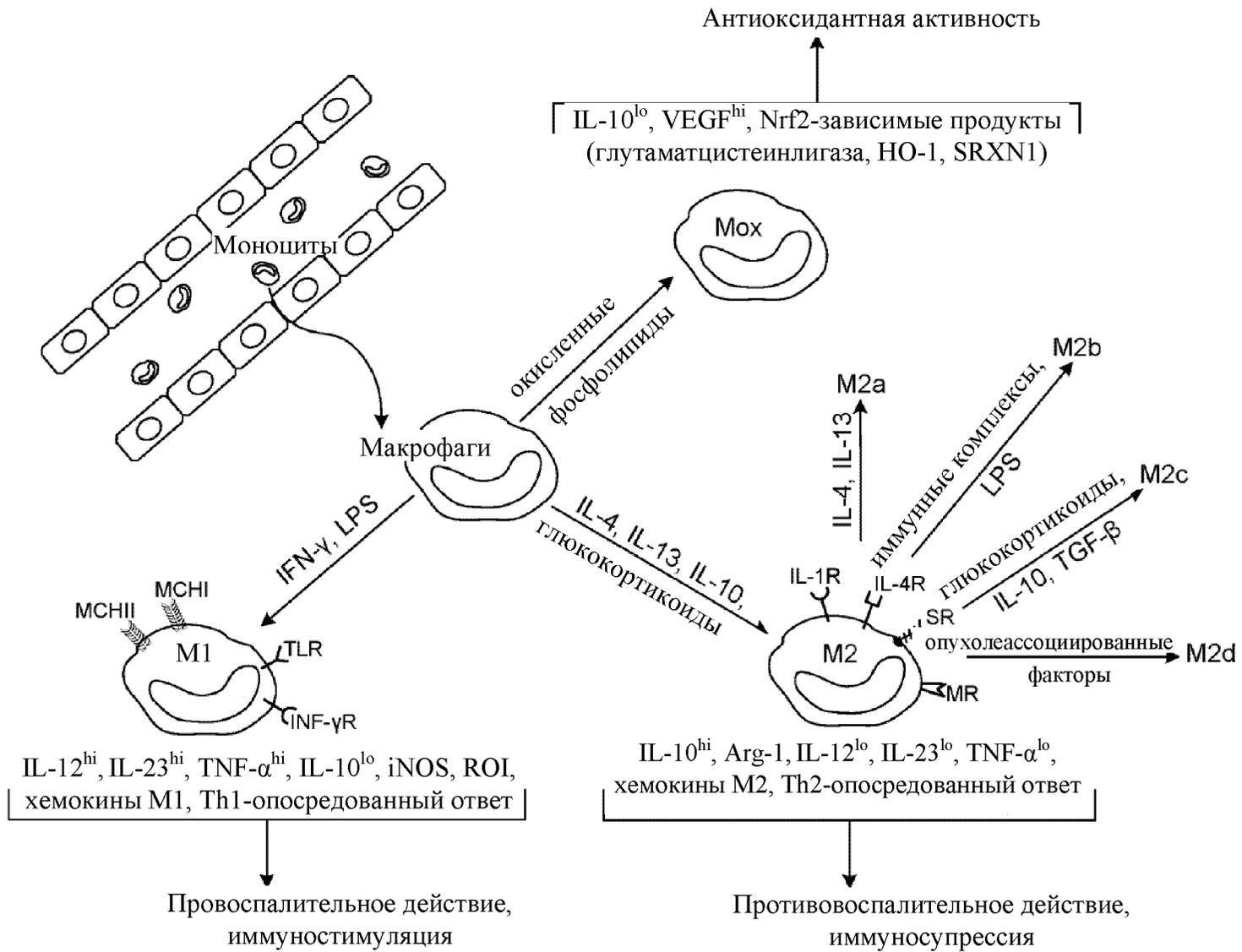


Фиг. 21С



34/35

Фиг. 22



Фиг. 23

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202392437**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

A61K 38/36 (2006.01)**A61P 7/04** (2006.01)

СПК:

A61K 38/4846**A61P 7/04****Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

A61K 38/36, 38/48, A61P 7/00, 7/04, 19/02, C07K19/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys, Pubmed**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	EA 201291480 A1 (БАЙОДЖЕН АЙДЕК ХЕМОФИЛИЯ ИНК.) 2013-09-30 Реферат, формула пп.1,2,11-21,44,45,54,114-121; [0077],[0092], табл.26	1-16
Y	WO 2014144549 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 2014-09-18 Реферат, формула пп.96-116,132; [0027],[0028], [0041],[0042], [0054],[0087], [0090], пример 4	1,5-8,13-16
Y	DUCORE J. M. ET AL. Alprolix (recombinant Factor IX Fc fusion protein): extended half-life product for the prophylaxis and treatment of hemophilia B EXPERT REVIEW OF HEMATOLOGY, 2014, vol. 7, no. 5, p. 559-71 doi:10.1586/17474086.2014.951322 Реферат, ключевые слова, с.559 правый столбец строки 7-13,с.562-564 пар. «Phase III clinical study in subjects with severe hemophilia B», с.565 левый столбец 3-4 абзацы, табл.1	1,4-8,10,13,14
Y	WYSEURE T. ET AL. Advances and Challenges in Hemophilic Arthropathy, SEMINARS IN HEMATOLOGY, 2016-01, Vol. 53, Issue 1, p. 10-19 doi:10.1053/j.seminhematol.2015.10.005 Реферат, с. 10 «Introduction», фиг.5, с. 15-16 «4.1.Synovial hypertrophy», с. 17 «5.Summary»	1-3,9-12
Y	BHAT V. ET AL., Vascular remodeling underlies rebleeding in hemophilic arthropathy, AM. J. HEMATOL., 2015-11, Vol. 90, No.11, p. 1027-1035 doi:10.1002/ajh.24133 Реферат, с. 1027-1028 «Introduction» «Methods», с.1031 левый столбец, последний абзац, с. 1033 правый столбец последний абзац	1-3,9,11-12

 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

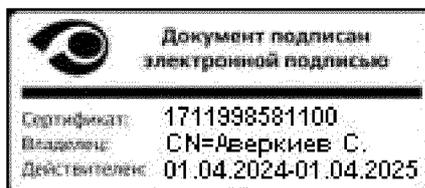
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 22 апреля 2024 (22.04.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев