



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010137743/10, 26.02.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.02.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.02.2008 US 61/032,006;
08.04.2008 US 61/043,354;
04.06.2008 US 61/058,869

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2012 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 20.01.2016 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2008011633 A2, 24.01.2008. WO 03031464 A2, 17.04.2003. ЛАРИОНОВА и др., Применение иммобилизованных физиологически активных веществ белковой природы в медицине, м. из-во МГУ, методич. пособие " Введение в прикладную энзимологию", 1982, с. 284-305. VERONESE F.M., et al, PEGylation, successful approach to drug delivery, Drug Discovery Today, 2005, (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 27.09.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2009/035339 (26.02.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/108806 (03.09.2009)Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ"

(72) Автор(ы):

ДЕФРИЗ Шон (US),
СТЕЕНСТРУП Томас Док (DK),
ВАНДАЛЬ Бриан Берг Стивсен (DK),
БОЛТ Герт (DK),
СТЕННИКЕ Хэннинг Ральф (DK),
ТИМ Ларс (DK)

(73) Патентообладатель(и):

НОВО НОРДИСК А/С (DK)

(54) КОНЬЮГИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ ФАКТОРА VIII

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению молекулы Фактора VIII с укороченным В-доменом и ковалентно конъюгированной с гидрофильным полимером, имеющей измененное время полужизни в кровотоке, и может быть

использовано в медицине для лечения гемофилии. Получают молекулу предшественника Фактора VIII с укороченным В-доменом, где В-домен соответствует аминокислотам 741-761 из SEQ ID NO 2. При этом указанная молекула ковалентно конъюгирована с ПЭГ или полисахаридом



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2010137743/10, 26.02.2009

(24) Effective date for property rights:
26.02.2009

Priority:

(30) Convention priority:
27.02.2008 US 61/032,006;
08.04.2008 US 61/043,354;
04.06.2008 US 61/058,869

(43) Application published: 10.04.2012 Bull. № 10

(45) Date of publication: 20.01.2016 Bull. № 2

(85) Commencement of national phase: 27.09.2010

(86) PCT application:
US 2009/035339 (26.02.2009)

(87) PCT publication:
WO 2009/108806 (03.09.2009)

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT"

(72) Inventor(s):
DEFRIZ Shon (US),
STEENSTRUP Tomas Dok (DK),
VANDAL' Brian Berg Stidsen (DK),
BOLT Gert (DK),
STENNIKE Khehning Ralf (DK),
TIM Lars (DK)

(73) Proprietor(s):
NOVO NORDISK A/S (DK)

(54) **CONJUGATED FACTOR VIII MOLECULES**

(57) Abstract:

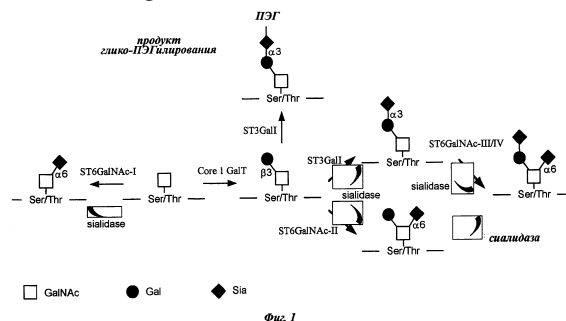
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology, namely to obtaining B-domain truncated factor VIII molecule and covalently conjugated with hydrophilic polymer, which has altered half-life in bloodstream, and can be used in medicine to treat haemophilia. Molecule of precursor of B-domain truncated factor VII, where B-domain corresponds to amino acids 741-761 from SEQ ID NO 2, is obtained. Said molecule is covalently conjugated with PEG or polysaccharide with size 10-80 kDa by means of O-linked oligosaccharide at serine residue in truncated B-domain, which corresponds to amino acid 750 in SEQ

ID NO 2.

EFFECT: invention makes it possible to increase factor VIII half-life in bloodstream.

8 cl, 8 dwg, 4 tbl, 7 ex



RU 2 573 587 C2

RU 2 573 587 C2

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к конъюгированным молекулам Фактора свертывания VIII. В частности, настоящее изобретение относится к конъюгированным молекулам Фактора свертывания VIII, имеющим измененное время полужизни в кровотоке.

Предшествующий уровень техники

[0002] Гемофилия А - это наследственная болезнь кровотечений, причиной которой является дефицит Фактора свертывания VIII (FVIII) или нарушение его активности. Клинические проявления затрагивают непервичный гемостаз - формирование кровяного сгустка протекает нормально, но сгусток нестабилен из-за того, что не происходит вторичное образование тромбина. Это заболевание лечат путем внутривенной инъекции Фактора свертывания FVIII, который либо выделяют из крови, либо получают рекомбинантным способом.

[0003] Современные рекомендации по лечению расходятся с традиционными способами лечения по возникновению жалобы и направлены на профилактику. Время полужизни в кровотоке эндогенного FVIII составляет 12-14 часов, и, таким образом, профилактическую терапию следует осуществлять несколько раз в неделю, чтобы у пациента фактически отсутствовали симптомы заболевания. Внутривенное введение для многих пациентов, особенно для детей и лиц молодого возраста, связано со значительными неудобствами и/или болью. Таким образом, в данной области техники существует необходимость в новых образцах Фактора VIII с активностью Фактора VIII, которые предпочтительно гомогенны по структуре, предпочтительно безопасны и предпочтительно имеют значительно увеличенное время полужизни в кровотоке, для того чтобы уменьшить число введений в неделю Фактора VIII. Кроме того, в данной области техники существует необходимость в сравнительно простых способах получения и производства таких молекул.

[0004] В данной области техники известно ПЭГилирование Фактора VIII, применяемое для увеличения времени его полужизни в кровотоке. Тем не менее получение безопасного продукта, обладающего гомогенной структурой, а также существенно улучшенным временем полужизни в кровотоке, является затруднительным. Имеющиеся способы получения конъюгированных молекул Фактора VIII являются часто трудоемкими и/или приводят к низкому выходу и/или получаемые продукты не гомогенны по структуре. В WO 2008011633 было предложено применение искусственным образом полученных сайтов О-сцепленного гликозилирования для получения терапевтических белков с длительным временем полужизни в кровотоке терапевтических белков, однако в этой заявке не были раскрыты конъюгированные молекулы Фактора VIII.

Сущность изобретения

[0005] В первом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле Фактора VIII с укороченным В-доменом, имеющей измененное время полужизни в кровотоке, причем указанная молекула ковалентно конъюгирована с гидрофильным полимером за счет О-связанного олигосахарида в укороченном В-домене, где активация Фактора VIII приводит к удалению ковалентно связанной боковой группы.

[0006] В других аспектах настоящее изобретение относится, кроме того, к способам получения таких молекул, к применению таких молекул и к фармацевтическим композициям, включающим такие молекулы.

[0007] Таким образом, предлагается конъюгированная молекула Фактора VIII с измененным временем полужизни в кровотоке, где конъюгированная боковая группа (например, гидрофильный полимер) удаляется в ходе активации. Молекулы по

изобретению предпочтительно имеют гомогенную структуру - по меньшей мере, с точки зрения положения гидрофильного полимера в укороченном В-домене - и предпочтительно имеют благоприятный профиль безопасности. Кроме того, здесь также представлены простые способы получения таких молекул. Предпочтительно, чтобы активированные молекулы Фактора VIII по изобретению были сходны с эндогенным активированным Фактором VIII.

Подробное описание изобретения

Определения:

[0008] Молекулы Фактора VIII: FVIII/Фактор VIII - это высокомолекулярный сложный гликопротеин, который изначально синтезируется гепатоцитами. FVIII состоит из 2351 аминокислот, включая сигнальный пептид, и содержит несколько отчетливо различных доменов, определяемых гомологией. Имеется три А-домена, уникальный В-домен и два С-домена. Порядок доменов можно представить как NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. FVIII циркулирует в плазме в виде двух цепей, разделенных по границе В-А3. Цепи соединены связями, опосредованными ионами двухвалентного металла. Цепь А1-А2-В называют тяжелой цепью (HC), а А3-С1-С2 - легкой цепью (LC).

[0009] Эндогенные молекулы Фактора VIII циркулируют *in vivo* в виде пула молекул с В-доменами различного размера. По всей вероятности, *in vivo* происходит постепенное энзиматическое отщепление В-домена, что приводит к формированию пула молекул с В-доменами различного размера. Принято считать, что расщепление по положению 740, в ходе которого удаляется последний фрагмент В-домена, происходит в связи с тромбиновой активации. Однако нельзя исключить, что вариант Фактора VIII, в котором, например, был поврежден сайт расщепления в положении 740, может быть активным.

[0010] В данном тексте термин "Фактор VIII", или "FVIII", относится к человеческому плазменному гликопротеину, который является участником внутреннего пути свертывания и необходим для свертывания крови. "Нативный FVIII" является полноразмерной молекулой человеческого FVIII, показанной в SEQ ID NO 1 (аминокислоты 1-2332). В-домен включает аминокислоты 741-1648 в SEQ ID N01.

[00H] SEQ ID N01:

ATTRY YLGAVELSWDYM QSDLGELPVDARFP RPVPKSF PFNTSWYKKTLFVEFTDH
 LFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTWITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
 QTSQREKEDDKVFP GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIG
 ALLVCREGLSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKM
 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI
 TFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDD
 LTDSEMDWRFD DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYK
 SQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGD TLLIIFKNQ
 ASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRC
 LTRY YSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRN VILFSVFDENRSWYL
 TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQT
 FLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALL
 KVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF SONS RHPSTRQKQFNATTIPENDIE
 KTDPWFAHRT PMPKI QNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPS PGAI
 D SNNLSSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPE SGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNL
 ISTIPSDNLMGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKL
 LESGLMNSQESSWGKNV SSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNN
 SATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMS

NKTTSKMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQG
 PSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVWGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNDNL
 HENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENWLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVEGSYDG
 AYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNT
 5 SQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKE
 KGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRK
 KDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLSATNSVTKKVENTVLP
 KPDLPKTSKGVPELLPKVHIYQKDLFPTETSNVSGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANR
 PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKKDTIL
 10 SLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQ
 EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL
 RNRAQSGSVPQFKKWFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGGLLPYIRAEVEDN1MVTFRNQ
 ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWA
 YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENM
 15 ERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENI
 HSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS
 TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW
 IKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV
 DSSGIKHNFNPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITA
 20 SSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVTTQGV
 KSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQGNQDSFTPWNSLDPPLLTRYLRI
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0012] Молекулы Фактора VIII по настоящему изобретению - это молекулы Фактора
 FVIII с укороченным В-доменом, где оставшиеся домены соответствуют
 25 последовательности, представленной аминокислотами 1-740 и 1649-2332 в SEQ ID NO
 1. Следовательно, молекулы по изобретению являются рекомбинантными молекулами,
 полученными в трансформированных клетках хозяина, предпочтительно в клетках
 млекопитающих. Тем не менее оставшиеся домены (т.е. три А-домена и два С-домена)
 могут незначительно различаться, например примерно на 1%, 2%, 3%, 4% или 5% от
 30 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO 1 (аминокислоты
 1-740 и 1649-2332). В частности, возможно введение аминокислотных модификаций
 (замен, делеций и т.п.) в остальные домены, например, с целью изменения связывающей
 способности Фактора VIII по отношению к различным компонентам, таким как,
 например, фактор vW, LPR, различные рецепторы, другие Факторы свертывания,
 35 клеточные поверхности и т.п. Кроме того, молекулы Фактора VIII по изобретению
 могут включать другие посттрансляционные модификации - например, в укороченном
 В-домene и/или в одном или более из остальных доменов молекул. Эти другие
 посттрансляционные модификации могут быть в форме различных молекул,
 конъюгированных с молекулой Фактора VIII по изобретению, таких как, например,
 40 полимерные соединения, пептидные соединения, соединения-производные жирных
 кислот и т.п.

[0013] Все молекулы Фактора VIII по настоящему изобретению - независимо от того,
 модифицированы они вне В-домена или нет, содержат ли иную посттрансляционную
 модификацию или нет - обладают активностью Фактора VIII (что подразумевает
 45 способность участвовать в каскаде реакций свертывания, причем их действие в
 функциональном отношении сходно или идентично FVIII), индуцируют образование
 FXa за счет взаимодействия с FIXa на активированных тромбоцитах и способствуют
 образованию кровяного сгустка. Эту активность можно оценивать in vitro способами,

хорошо известными в данной области техники, такими как, например, анализ свертывания, анализ эндогенного потенциала тромбина и т.п. Молекулы Фактора VIII по настоящему изобретению имеют активность FVIII, составляющую по меньшей мере около 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и 100% или даже более 100% от активности нативного человеческого FVIII.

[0014] В-домен: В-домен Фактора VIII охватывает аминокислоты 741-1648 в SEQ ID NO 1. В-домен расщепляется по нескольким различным сайтам, что приводит к высокой гетерогенности циркулирующих в плазме молекул FVIII. Конкретная функция высокогликозилированного В-домена не известна. Известно, что этот домен не существен для активности FVIII в каскаде реакций свертывания. Это предположение о вероятном отсутствии функции подтверждается тем фактом, что FVIII с делецией/с укороченным В-доменом, оказывается, обладает *in vivo* свойствами, идентичными тем, которые наблюдаются для полноразмерного нативного FVIII. С другой стороны, имеются свидетельства тому, что В-домен может уменьшать связывание белка с клеточной мембраной, по меньшей мере, в условиях отсутствия сыворотки.

[0015] Молекула Фактора VIII с укороченным В-доменом/с делецией В-домена: Эндогенный полноразмерный FVIII синтезируется в виде одноцепочечной молекулы-предшественника. Перед секрецией молекула-предшественник расщепляется на тяжелую цепь и легкую цепь. Для получения рекомбинантного FVIII с делецией В-домена можно применить две различные стратегии. Либо синтезируют отдельно тяжелую цепь без В-домена и легкую цепь в виде двух различных полипептидных цепей (двухцепочечная стратегия), либо FVIII или FVIII с делецией В-домена синтезируют в виде единственной полипептидной цепи-предшественника (одноцепочечная стратегия), которая расщепляется на тяжелую и легкую цепи таким же образом, как и полноразмерный предшественник FVIII.

[0016] В полипептиде-предшественнике FVIII с делецией В-домена участки тяжелой и легкой цепи обычно разделены линкером. Чтобы минимизировать риск введения иммуногенных эпитопов в FVIII с делецией В-домена, последовательность линкера предпочтительно получают из В-домена FVIII. Линкер должен включать сайт узнавания для протеазы, которая расщепляет полипептид-предшественник FVIII с делецией В-домена на тяжелую и легкую цепь. В В-домене полноразмерного FVIII данный сайт узнавания составляют аминокислоты 1644-1648. Тромбиновый сайт, приводящий к удалению линкера при активации FVIII с делецией В-домена, расположен в тяжелой цепи. Таким образом, маловероятно, чтобы размер и аминокислотная последовательность линкера влияли на его удаление из остальной молекулы FVIII при активации тромбином. При производстве FVIII удобно осуществлять делецию В-домена. Тем не менее можно включать фрагменты В-домена в линкер без снижения продуктивности. Негативный эффект В-домена на продуктивность не связывают с каким-либо конкретным размером В-домена или конкретной его последовательностью.

[0017] Укороченный В-домен может содержать несколько сайтов О-гликозилирования. Тем не менее в предпочтительном воплощении молекула включает только один, как вариант два, три или четыре О-связанных олигосахаридов в укороченном В-домене.

[0018] В предпочтительном воплощении укороченный В-домен включает только один сайт потенциального О-гликозилирования и гидрофильный полимер ковалентно конъюгирован по этому сайту О-гликозилирования.

[0019] О-связанные олигосахариды в молекулах по изобретению с укороченным В-

доменом могут быть присоединены по сайтам О-гликозилирования, которые были искусственно получены рекомбинантным способом и/или за счет выведения на поверхность молекулы "скрытых" сайтов О-гликозилирования путем укорочения В-домена. В обоих случаях подобные молекулы можно создавать путем разработки аминокислотной последовательности Фактора VIII с укороченным В-доменом и последующего проведения *in silico* анализа данной аминокислотной последовательности, с помощью которого можно предсказать вероятность образования сайтов О-гликозилирования в укороченном В-доме. Молекулы со сравнительно высокой вероятностью присутствия таких сайтов гликозилирования можно синтезировать в подходящих клетках хозяина, с последующим анализом паттерна гликозилирования, а затем произвести отбор молекул с О-сцепленным гликозилированием в укороченном В-доме. Подходящие клетки хозяина для получения рекомбинантного белка Фактора VIII предпочтительно должны происходить от млекопитающих для того, чтобы можно было гарантировать гликозилирование молекулы. При осуществлении на практике настоящего изобретения эти клетки являются клетками млекопитающих, более предпочтительно - устойчивой клеточной линией, включая, без ограничения, линии клеток CHO (например, ATCC CCL 61), COS-1 (например, ATCC CRL 1650), фибробласты почки сирийского хомячка (ВНК) и НЕК293 (например, ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Предпочтительной линией клеток ВНК является клеточная линия tk-ts13 ВНК (Waechter and Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:1106-1110, 1982), здесь и далее обозначенная как клетки ВНК 570. Линия клеток ВНК 570 доступна в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, с регистрационным номером в базе данных ATCC (accession number) CRL 10314. Линия клеток tk-ts13 ВНК доступна также в ATCC под регистрационным номером CRL 1632. Предпочтительной линией клеток CHO является линия клеток CHO K1, доступная в ATCC под регистрационным номером CC161, а также клеточные линии CHO-DXB11 и CHO-DG44.

[0020] Другие приемлемые клеточные линии включают, без ограничения, Rat Hep I (гепатома крысы; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (гепатома крысы; ATCC CRL 1548), ТСМК (ATCC CCL 139), легкое человека (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1); клетки DUKX (линия клеток CHO) (Uriaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980) (клетки DUKX, обозначаемые также как клетки DXB11), а также DG44 (линия клеток CHO) (Cell, 33: 405, 1983; Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986). Можно применять также клетки ЗТЗ, клетки Namalwa, клетки миеломы и слияния миелом с другими клетками. В некоторых воплощениях такими клетками могут быть мутантные или рекомбинантные клетки, такие как, например, клетки, которые экспрессируют в количественном и качественном отношении иной спектр энзимов, катализирующих посттрансляционную модификацию белков (например, энзимов гликозилирования, таких как гликозилтрансферазы и/или гликозидазы, или ферментов процессинга, например пропептидов), чем тот тип клеток, от которого они произошли. Особенно предпочтительны клетки DUKX (линия клеток CHO).

[0021] На данный момент предпочтительны клетки НЕК293, COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO), фибробласты почки сирийского хомячка (ВНК) и клетки миеломы, особенно клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[0022] Таким образом, авторы настоящего изобретения показали, что существует возможность активировать "скрытые" сайты О-гликозилирования в В-доме Фактора VIII путем укорочения В-домена. Чтобы не привязываться к конкретной теории, это явление можно объяснить третичной структурой молекулы в укороченном В-доме,

где происходят изменения. Таким образом, "скрытые" сайты O-гликозилирования становятся "доступными" для гликозилирования в укороченном В-домене. Одним из преимуществ такого подхода является обеспечение приемлемого профиля безопасности рекомбинантных молекул с точки зрения, например, аллергенности. Другим его 5 преимуществом является то, что этот подход предоставляет более простой путь получения вариантов с укороченным В-доменом, содержащих O-связанные олигосахариды в В-домене, благодаря изначальной присутствию сайтов гликозилирования в В-домене, поскольку ранее было показано, что создавать искусственные сайты O-гликозилирования в рекомбинантных белках трудно.

10 [0023] Длина В-домена в молекуле FVIII дикого типа (wt) составляет около 907 аминокислот. Длина укороченного В-домена в молекулах по настоящему изобретению может варьироваться от примерно 10 аминокислот до примерно 700 остатков, например около 12-500 аминокислот, 12-400 аминокислот, 12-300 аминокислот, 12-200 15 аминокислот, 15-100 аминокислот, 15-75 аминокислот, 15-50 аминокислот, 15-45 аминокислот, 20-45 аминокислот, 20-40 аминокислот или 20-30 аминокислот.

Укороченный В-домен может включать фрагменты тяжелой цепи и/или короткой цепи и/или искусственно введенной последовательности, которая не присутствует в молекуле wt FVIII. Термины "с укороченным В-доменом" или "с делецией В-домена" в данном описании можно употреблять равнозначно.

20 [0024] Измененное время полужизни в кровотоке: Молекулы по настоящему изобретению имеют измененное время полужизни в кровотоке по сравнению с молекулой Фактора VIII дикого типа, предпочтительно увеличенное время полужизни в кровотоке. Время полужизни в кровотоке предпочтительно увеличено по меньшей 25 мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 15%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 25%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 35%, предпочтительно по меньшей мере на 40%, предпочтительно по меньшей мере на 45%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 55%, предпочтительно по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 65%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 100%, более предпочтительно по меньшей мере на 125%; более предпочтительно по меньшей мере на 150%, более предпочтительно по меньшей мере на 175%, более 35 предпочтительно по меньшей мере на 200% и более предпочтительно по меньшей мере на 250% или 300%. И еще более предпочтительно, чтобы такие молекулы имели время полужизни в кровотоке, которое увеличено по меньшей мере на 400%, 500%, 600% или даже на 700% по отношению ко времени полужизни в кровотоке FVIII дикого типа.

40 [0025] Гидрофильный полимер: Модифицирующая группа/гидрофильный полимер по настоящему изобретению предпочтительно не должны быть природными. В одном примере "не встречающейся в природе модифицирующей группой" является полимерная модифицирующая группа, в которой по меньшей мере один полимерный фрагмент не является природным. В другом примере не встречающейся в природе модифицирующей группой является модифицированный углевод. Местоположение функционализации 45 посредством модифицирующей группы выбирают таким образом, чтобы не происходило предотвращение энзиматического присоединения "модифицированного сахара" к полипептиду. Понятие "модифицированный сахар" относится также к любому остатку-миметику гликозила, который может быть функционализирован с помощью

модифицирующей группы и который является субстратом для природного или модифицированного энзима, например для гликозилтрансферазы.

[0026] Полимерная модифицирующая группа, присоединяемая к полипептиду, может изменять свойства такого полипептида, например его биодоступность, биологическую активность или время полужизни в организме. Типичные полимеры по изобретению включают водорастворимые полимеры, которые могут быть линейными или разветвленными, могут содержать одну или более независимо выбранных полимерных частиц, таких как полиалкиленгликоль и его производные. Полимерная модифицирующая группа по изобретению может включать водорастворимый полимер, например полиэтиленгликоль - ПЭГ (PEG) - и его производные (m-PEG), полипропиленгликоль и его производные (PPG, m-PPG) и т.п.

[0027] Термин "водорастворимый" относится к молекулам, которые в некоторой степени растворимы в воде и их растворимость можно детектировать. Способы детектирования и/или оценки растворимости в воде хорошо известны в данной области техники. Приведенные в примерах водорастворимые полимеры по изобретению включают пептиды, сахараиды, полиэферы, полиамины, поликарбоновые кислоты и т.п. Пептиды могут иметь смешанные последовательности, а могут быть составлены из единственной аминокислоты - например полилизина. Примером полисахарида является полисиаловая кислота. В качестве примера полиэфира представлен полиэтиленгликоль, например m-PEG. Полиэтиленмин является примером полиамина, а полиакриловая кислота - примером поликарбоновой кислоты.

[0028] Полимерным скелетом водорастворимого полимера по изобретению может быть полиэтиленгликоль (т.е. ПЭГ). Термин "ПЭГ в связи с настоящим изобретением включает полиэтиленгликоль в любой из его форм, включая алкокси-ПЭГ, бифункциональный ПЭГ, многофункциональный (multiarmed) ПЭГ, вилообразный (forked) ПЭГ, разветвленный ПЭГ, ПЭГ с боковыми заместителями (pendent) (т.е. ПЭГ или родственные ему полимеры, содержащие одну или более функциональных групп, присоединенных к полимерному скелету), или же ПЭГ, содержащий внутри себя деградируемые связи.

[0029] Полимерный скелет может быть линейным или разветвленным. Разветвленные полимерные скелеты в общем виде известны в данной области техники. Как правило, разветвленный полимер содержит центральную сердцевинную структуру (central branch core moiety) и множество линейных полимерных цепей, присоединенных к центральной сердцевинной структуре. ПЭГ обычно применяется в его разветвленных формах, которые можно получить путем добавления оксида этилена к различным полиолам, таким как глицерин, пентаэритрит и сорбит. Центральную структуру можно также получить из некоторых аминокислот, таких как лизин или цистеин. В одном примере разветвленный полиэтиленгликоль можно представить общей формулой вида R(-ПЭГ-ОН)_m, где R представляет собой ядро полимера, например глицерин или пентаэритрит, а m - число ветвей. Многофункциональные (multiarmed) молекулы ПЭГ, например, те, что описаны в патенте США №5932462, включенном в настоящее описание полностью посредством ссылки, также можно применять в качестве полимерного скелета.

[0030] На Фиг.8 показан пример разветвленного полимера ПЭГ, применяемый в воплощениях данного изобретения, обозначенный здесь как "SA-глицерин-ПЭГ." На Фиг.8А показан пример компонента SA-глицерин-ПЭГ полимеров SMP-SA-глицерин-ПЭГ или SA-глицерин-ПЭГ, присоединенного к гликану или к аминокислоте полипептида. На Фиг.8 В показан фрагмент SA-глицерин-ПЭГ, присоединенный гликану или полипептиду через остаток галактозы (Gal). На Фиг.8С показан фрагмент SA-

глицерин-ПЭГ, присоединенный к гликану или полипептиду через остаток Gal-GalNAc. На Фиг.8D показан фрагмент SA-глицерин-ПЭГ, присоединенный к аминокислоте полипептида через группу Gal-GalNAc. В различных воплощениях AA - это треонин или серин. В одном примере воплощения AA превращается в сайт O-сцепленного гликозилирования путем делеции В-домена полипептида FVIII. Обсуждение в нижеследующем абзаце [0032], касающееся молекулярного веса этого полимера, в общем случае применимо к разветвленному ПЭГ, показанному на Фиг.8. На Фиг.8 индекс "n" может быть любым целым числом, которое соответствует линейному (или же разветвленному) полимеру m-PEG желаемого молекулярного веса, что обсуждено в абзаце [0032]. В различных воплощениях "n" выбирают таким образом, чтобы линейный фрагмент m-PEG составлял примерно от 20 кДа до 40 кДа, например, около 20 кДа, около 30 кДа или около 40 кДа. Целые числа, соответствующие этим молекулярным весам m-PEG, составляют от примерно 400 (например, около 455) до примерно 900 (например, около 910). Соответственно, "n" выбирают таким образом, чтобы получить разветвленный ПЭГ с молекулярным весом примерно от 40 кДа до 80 кДа, например, около 40 кДа, около 50 кДа, около 60 кДа, около 70 кДа или около 80 кДа.

[0031] Многие другие полимеры также можно применять в данном изобретении. Особенно применимы в данном изобретении полимерные скелеты, которые имеют непептидную природу и являются водорастворимыми. Примеры подходящих полимеров включают, без ограничения, другие полиалкиленгликоли, например полипропиленгликоль ("PPG"), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля и им подобные, полиоксиэтилированный полиол, полиолефиновый спирт, поливинилпирролидон, полигидроксипропилметакриламид, поли([альфа]-гидроксикислота), поливиниловый спирт, полифосфазен, полиоксазолин, поли(М-акрилоилморфолин), такие как описанные в патенте США №5629384, который включен в настоящее описание полностью посредством ссылки, а также их сополимеры, терполимеры и их смеси.

[0032] Несмотря на то что молекулярный вес каждой цепи полимерного скелета может варьироваться, обычно он находится в пределах примерно от 100 Да до 160000 Да, например, приблизительно от 5000 Да до 100000 Да. Более конкретно, размер каждого конъюгированного гидрофильного полимера по настоящему изобретению может варьироваться примерно от 500 Да до 80000 Да, как, например, примерно от 1000 Да до 80000 Да; примерно от 2000 Да до 70000 Да; примерно от 5000 до 70000 Да; примерно от 5000 до 60000 Да; примерно от 10000 до 70000 Да; примерно от 20000 до 60000 Да; примерно от 30000 до 60000 Да; примерно от 30000 до 50000 Да; или примерно от 30000 до 40000 Да. Следует понимать, что эти размеры представляют собой скорее оценку, чем точные значения. В предпочтительном воплощении молекулы по изобретению конъюгированы с гетерогенной популяцией гидрофильных полимеров, таких как, например, ПЭГ размером, например, 10000, 40000 или 80000 Да ± примерно 5000, примерно 4000, примерно 3000, примерно 2000 или примерно 1000 Да.

[0033] O-связанный олигосахарид: Как N-гликаны, так и O-гликаны присоединяются к белкам клетками, продуцирующими данный белок. Клеточный аппарат N-гликозилирования распознает и гликозилирует сигнальные последовательности N-гликозилирования (мотивы N-X-S/T) в аминокислотной цепи, когда насцентный белок перемещается из рибосомы в эндоплазматический ретикулум (Kiely et al. 1976; Glabe et al. 1980).

[0034] Аналогично O-гликаны присоединяются по специфическим сайтам O-

гликозилирования в аминокислотной цепи, но мотивы, запускающие O-гликозилирование, гораздо более гетерогенны, чем сигналы N-гликозилирования, и мы до сих пор не способны адекватным образом предсказывать сайты O-гликозилирования в аминокислотной последовательности (Julenius et al. 2004). Поэтому создание искусственных сайтов O-гликозилирования связано в некоторой мере с неопределенностью. Принято считать, что нативная молекула FVIII не содержит сайтов O-гликозилирования, и, таким образом, опытный специалист предположил бы, что следует создать по меньшей мере один искусственный сайт O-гликозилирования и вставить его в В-домен в связи с осуществлением на практике настоящего изобретения.

[0035] O-связанный олигосахарид в укороченном В-домене Фактора VIII можно, таким образом, присоединить к природной последовательности O-сцепленного гликозилирования или к последовательности O-сцепленного гликозилирования, которая была искусственно создана рекомбинантным способом.

[0036] В предпочтительном воплощении настоящего изобретения O-связанный олигосахарид присоединен к природной последовательности O-сцепленного гликозилирования, которая не подвержена гликозилированию в молекуле Фактора VIII дикого типа, но становится доступной для O-гликозилирования вследствие укорочения В-домена. Пример такой последовательности приведен в Примерах и в SEQ ID NO 2 (укороченный В-домен соответствует аминокислотам 742-763). Возможно, что "скрытый" сайт O-гликозилирования в SEQ ID NO 2 также будет гликозилирован, даже если укорочение В-домена произойдет где-то в другом месте, т.е. если укороченный В-домен будет несколько короче (например, на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот короче, чем SEQ ID NO 2) или длиннее (например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO 2. Такой подход, связанный с активацией "скрытого" сайта O-гликозилирования путем укорочения В-домена, а не с созданием искусственного сайта O-гликозилирования, имеет преимущество в том, что создается молекула с благоприятным профилем безопасности (т.е. со сниженной аллергенностью и т.д.). Могут быть аналогично активированы и другие сайты O-гликозилирования в В-домене Фактора VIII при укорочении молекул различным образом.

[0037] Глико-ПЭГилирование O-связанного олигосахаридов: Биосинтез O-гликанов можно модифицировать и прерывать добавлением остатков сиаловой кислоты на сравнительно ранних этапах биосинтеза. Определенные ферменты - сиалилтрансферазы - способны воздействовать на GalNAc α -Ser/Thr или же на подтипы структур (core subtypes) O-гликанов ранней стадии биосинтеза, после воздействия фермента Core 1 GalT. Термин «Т-антиген» (T antigen) связан с присутствием дисахарида Galp1-3GalNAc α -Ser7Thr. При синтезе таких структур возникает конкуренция между гликозилтрансферазами за один и тот же субстрат, и, таким образом, уровни экспрессии гликозилтрансфераз и их субклеточное распределение в аппарате Гольджи определяют структурный выход в биосинтезе O-гликанов и их разнообразие. Как показано на Фиг.1, глико-ПЭГилированию подвержен только дисахарид Galp1-3GalNAc α -Ser/Thr.

[0038] Тем не менее доступное количество этой структуры можно существенно увеличить путем обработки белка сиалидазой или ферментом Core1 GalT, или же их комбинацией. Результатом процесса глико-ПЭГилирования является присоединение сиаловой кислоты-ПЭГ к нативной структуре за счет образования α 3-связи с дисахаридом Galp1-3GalNAc α -Ser/Thr белка-мишени (Фиг.1).

[0039] Другие гидрофильные полимеры также можно присоединять к O-связанным олигосахаридам. Основным требованием для ферментативного конъюгирования других гидрофильных полимеров с FVIII посредством O-гликана является возможность их

присоединения к производному глицил-сиаловой кислоты за счет свободной аминоксиппы, что раскрыто в WO 03031464. Для достижения этой цели существует большое разнообразие химических способов конъюгирования, известных специалистам в данной области техники. Примеры активированного биосовместимого полимера
5 включают оксиды полиалкилена, такие как, без ограничения, полимеры полиэтиленгликоль (ПЭГ) и 2-(метакрилоилокси)этил фосфорилхолин (mPC) (как описано в WO 03062290), декстраны, коломиновые кислоты (colominic acids) или другие полимеры углеводной природы, полимеры аминоксипп или специфических пептидных последовательностей, производные биотина, поливиниловый спирт (PVA),
10 поликарбоксилаты, поливинилпирролидон, полиэтилен-со-ангидрид малеиновой кислоты, полистирол-со-ангидрид малеиновой кислоты, полиозазолин, поли(акрилоилморфолин), гепарин, альбумин, целлюлозы, гидролизаты хитозана, крахмалы, например гидроксиэтилен-крахмалы и гидроксипропил-крахмалы, гликоген, агарозы и их производные, гуаровая смола, пуллулан, инулин, ксантановая смола, каррагинан,
15 пектин, гидролизаты альгиновой кислоты, другие полимеры и любые их эквиваленты.

[0040] Фармацевтическая композиция: В данном описании подразумевается, что термин «фармацевтическая композиция» предпочтительно охватывает композиции, включающие молекулы Фактора VIII по настоящему изобретению, подходящие для парентерального введения, такие как, например, готовые к использованию стерильные
20 водные композиции или сухие стерильные композиции, которые можно растворять, например, в воде или водном буфере. Композиции по изобретению могут включать различные фармацевтически приемлемые эксципиенты, стабилизаторы и т.д.

[0041] Дополнительные ингредиенты в таких композициях могут включать увлажняющие вещества, эмульгаторы, антиоксиданты, объемобразующие агенты,
25 агенты, регулирующие тоничность, хелатирующие агенты, ионы металлов, маслянистые растворители, белки (например, человеческий сывороточный альбумин, желатин или белки) и цвиттер-ион (например, аминоксиппу, такую как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Подобные дополнительные ингредиенты, разумеется, не должны оказывать негативный эффект на общую стабильность препарата по
30 настоящему изобретению. Парентеральное введение можно осуществлять путем подкожной, внутримышечной, внутривбрюшинной или внутривенной инъекции с помощью шприца, возможно шприца-ручки. В другом варианте парентеральное введение можно проводить с помощью инфузионного насоса. Другим вариантом является композиция, которая может представлять собой раствор или суспензию для введения
35 соединения FVIII в форме назального или пульмонального спрэя. В качестве еще одного варианта фармацевтические композиции, содержащие соединение FVIII по изобретению, могут быть также приспособлены для чрескожного введения, например, путем инъекции без применения иглы или в форме наклейки, возможно наклейки для ионтофореза, или же для трансмукозального, например трансбуккального введения.

[0042] Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле Фактора VIII с укороченным В-доменом, имеющей измененное время полужизни в кровотоке, причем указанная молекула ковалентно конъюгирована с гидрофильным полимером посредством О-связанного олигосахарида в укороченном В-домене, при этом активация Фактора VIII (активация молекулы) приводит к удалению ковалентно
45 конъюгированного полимера.

[0043] Согласно одному воплощению гидрофильным полимером является ПЭГ. Размер полимера ПЭГ может варьироваться примерно от 10000 до 160000 Да; например, от 10000 до 80000 Да, например, около 10000; 15000; 20000; 25000; 30000; 35000; 40000;

45000; 50000; 55000; 60000; 65000, 70000; 75000; или 80000 Да. Предпочтительно, чтобы О-связанный олигосахарид был присоединен по сайту О-гликозилирования, который был получен путем укорочения В-домена, а не путем вставки искусственного сайта О-гликозилирования, не присутствующего в молекуле wt FVIII.

5 [0044] Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, молекула по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 2. Такие молекулы имеют уникальную особенность в том, что активированная молекула FVIII идентична нативной активной молекуле FVIII. Эта особенность, по-видимому, дает более удачные характеристики в испытаниях на
10 безопасность.

[0045] Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, включающим молекулы по настоящему изобретению.

[0046] Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу получения молекулы по настоящему изобретению, причем указанный способ включает конъюгацию молекулы
15 Фактора VIII с укороченным В-доменом с гидрофильным полимером, таким как, например, группа ПЭГ, посредством О-связанного олигосахаридов в укороченном В-домене. Следовательно, настоящее изобретение также относится к молекулам, которые получены или которые можно получить таким способом.

[0047] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения
20 гемофилии, включающему введение пациенту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества молекул по изобретению.

[0048] В данном описании термин "лечение" относится к лекарственной терапии
любого человека или животного, которые в этом лечении нуждаются. Предполагается, что указанный пациент прошел медицинский осмотр врачом-терапевтом, который
25 поставил предварительный или окончательный диагноз, который указывал бы на то, что применение вышеупомянутого специального лечения будет благотворным для здоровья указанного пациента-человека или животного. Время проведения и цель указанной терапии может варьироваться от одного пациента к другому в соответствии с состоянием его здоровья. Таким образом, указанная терапия может быть
30 профилактической, смягчающей, симптоматической и/или лечебной.

[0049] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению молекулы по изобретению в качестве лекарства, а также к применению молекулы по изобретению для изготовления лекарства для лечения гемофилии.

[0050] В последнем аспекте настоящее изобретение относится к способу разработки
35 молекулы Фактора VIII с укороченным В-доменом по настоящему изобретению, который включает (i) укорочение В-домена и, возможно, проведение анализа аминокислотной последовательности этой укороченной молекулы Фактора VIII для выявления потенциальных сайтов О-сцепленного гликозилирования, (ii) синтез молекул в подходящих клетках хозяина и (iii) отбор молекул, содержащих О-связанные гликаны
40 в укороченном В-домене.

Краткое описание графических материалов

[0051] На рисунках размер конъюгированных групп в некоторых случаях обозначен как "К", и здесь имеется в виду, что это эквивалент кДа (килодальтон).

[0052] Фиг.1: Схематическое изображение процесса глико-ПЭГилирования О-
45 связанных олигосахаридов. Данная схема не представляет исчерпывающий перечень возможных путей, приводящих к продуктам, получаемых в примерах.

[0053] Фиг.2: Ионообменная хроматография реакционной смеси на смоле Source 15Q (A). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с

молекулярными маркерами (слева) собранной фракции (B).

[0054] Фиг.3: Очистка продукта с блокированными группами на смоле Superdex 200 в ходе эксклюзионной хроматографии.

[0055] Фиг.4: Свертывающая активность О-глико-ПЭГилированного rFVIII при использовании различных реагентов aPTT. (A) - соотношение между свертывающей активностью и хромогенной активностью. (B) - удельная свертывающая активность.

[0056] Фиг.5: In vivo эффекты соединения 40К-ПЭГ-[O]-N8 (время до наступления окклюзии) у мышей FVIII KO.

[0057] Фиг.6: Блок-схема, отображающая стадии способа, задействованные при получении глико-ПЭГилированного Фактора FVIII по изобретению.

[0058] Фиг.7: Схематическое представление молекулы Фактора VIII по настоящему изобретению, полученной в Примерах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Получение рекомбинантного О-гликозилированного Фактора VIII с укороченным В-доменом

[0059] Пример аминокислотной последовательности молекулы Фактор VIII с делецией В-домена дан в SEQ ID NO 2. Этот полипептид можно также обозначить как "N8". Эта молекула включает 21-аминокислотную последовательность линкера (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR - подчеркнутое S - это остаток серина с О-гликаном, который ПЭГилирован в Примере 2).

[0060] Молекулы Фактора VIII по настоящему изобретению могут быть обозначены в Примерах различным образом - но все упоминания молекул Фактора VIII относятся к молекулам Фактора VIII по изобретению или в других случаях к молекулам Фактора VIII в процессе превращения в молекулы Фактора VIII по изобретению.

[0061] SEQ ID NO 2:

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFNFNTSWYKKTFLVFEFTDH
 LFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTWITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
 QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIG
 ALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKM
 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI
 TFLTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDD
 LTDSEMDWRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYK
 SQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIIFKNQ
 ASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRC
 LTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL
 TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGA QTD
 FLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALL
 KVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSQNPPVLKRHQRREITRT
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMS
 SSPHVLRNRAQSGSVPQFKKWFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIM
 VTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFWKVQHMAPTKDEF
 DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSW
 YFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSM
 GSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHL
 HAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWST
 KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLM
 VFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI

SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG
 VTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPWNSLDPPL
 LTRYLRINPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Линия клеток и способ культивирования:

5 [0062] С помощью кДНК Фактора VIII была разработана плаزمида для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующая Фактор VIII с делецией В-домена (BDD), имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 2. Эта плазмида кодирует тяжелую цепь Фактора VIII, включающую аминокислоты 1-740
 10 включающую аминокислоты 1649-2332 полноразмерного человеческого Фактора VIII. Последовательности тяжелой и легкой цепей соединены 21-аминокислотным линкером с последовательностью аминокислот 741-750 и 1638-1648 полноразмерного человеческого Фактора VIII. Клетки яичника китайского хомячка (CHO) трансфецировали плазмидой, кодирующей Фактор VIII BDD, и производили отбор с помощью
 15 дигидрофолатредуктазной системы, что в конечном счете приводило к клональной суспензии клеток-продуцентов, культивируемых в среде, свободной от животных компонентов.

[0063] Первой стадией способа является посев виала клеток из виала рабочего банка клеток в среду для выращивания определенного химического состава, свободную от
 20 животных компонентов. После оттаивания клетки сначала инкубировали в матрасе (T-flask). Через один или два дня после оттаивания клетки перемещали в колбу шейкера и объем культуры увеличивали путем последовательных разведений, так чтобы выдерживать плотность клеток в пределах $0.2-3.0 \times 10^6$ клеток/мл. Следующей стадией является перемещение культуры из колбы шейкера в засеваемые биореакторы. На этой
 25 стадии объем культуры еще возрастал перед конечным переносом в производственный биореактор. На всех стадиях увеличения объема инокулята применяли ту же среду определенного химического состава, свободную от животных компонентов. После переноса в производственный биореактор в среду добавляли компоненты, которые повышают концентрацию продукта. В производственном биореакторе клетки
 30 культивировали в циклическом периодическом процессе, где время цикла составляет три дня. При сборе выращенных клеток 80-90% культурального объема перемещали в резервуар для сбора клеток. Оставшуюся культуральную жидкость затем разбавляли свежей средой так, чтобы получить исходную плотность клеток, и затем начинали
 35 новый период культивирования.

[0064] Порцию собранного материала осветляли путем центрифугирования и фильтрации и перемещали его в резервуар для хранения перед началом процесса очистки. К собранному материалу, не содержащему клетки, добавляли буфер в резервуар для хранения для стабилизации pH.

40 [0065] По окончании производственного цикла клетки собирали и замораживали, для того чтобы получить банк клеток по окончании производства. Этот банк клеток тестировали на микоплазму, стерильность и загрязненность вирусами.

Очистка:

[0066] Для выделения Фактора VIII с делецией В-домена из культуральной клеточной среды применяли четырехстадийный способ очистки, включающий стадию
 45 концентрирования на колонке Capto MMC, стадию иммуноаффинной (immunoabsorbent) хроматографии, стадию анионообменной хроматографии и, наконец, стадию гелефильтрации. Как правило, применяли следующий способ: 11 литров стерильной фильтрованной среды наносили с помощью насоса на колонку (1.6x12 см) Capto MMC

(GE Healthcare, Швеция), уравновешенную в буфере А: 20 мМ имидазол, 10 мМ CaCl₂, 50 мМ NaCl, 0.02% Tween 80, pH=7.5, при скорости потока 15 мл/мин. Колонку промывали с помощью 75 мл буфера А с последующей промывкой с помощью 75 мл буфера А, содержащего 1.5 М NaCl. Белок элюировали с помощью 20 мМ имидазола, 10 мМ CaCl₂, 0.02% Tween 80, 2.5 М NaCl, 8 М этиленгликоля, pH=7.5, при скорости потока 1 мл/мин. Собирали фракции по 8 мл и анализировали их на активность Фактора VIII (КоА-тест). Объединяли фракции, содержащие фактор VIII, и, как правило, получали суммарный объем порядка 50 мл.

[0067] Были разработаны моноклональные антитела к Фактору VIII (Kjajke Eur J Biochem 234 773). В ходе картирования эпитопов (результаты не приведены) было обнаружено, что эти антитела (F25) распознают дальний С-концевой участок последовательности тяжелой цепи от аминокислотного остатка 725 до 740. Антитела F25 были иммобилизованы на NHS-активированной смоле Sepharose 4 FF (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Упсала, Швеция) при плотности, составляющей 2.4 мг на мл геля, по существу, как описано производителем. Собранный в предыдущей стадии пул разбавляли в 10 раз с помощью 20 мМ имидазола, 10 мМ CaCl₂, 0.02% Tween 80, pH=7.3 и наносили на колонку с F25 Sepharose (1.6×9.5 см), уравновешенную с помощью 20 мМ имидазола, 10 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, 0.02% Tween 80, 1 М глицерина, pH=7.3, при скорости потока 0.5 мл/мин. Колонку промывали уравнивающим буфером до тех пор, пока сигнал в УФ-области не становился постоянным, а затем с помощью 20 мМ имидазола, 10 мМ CaCl₂, 0.65 М NaCl, pH=7.3 до тех пор, пока сигнал в УФ-области снова не становился постоянным. Фактор VIII элюировали с помощью 20 мМ имидазола, 10 мМ CaCl₂, 0.02% Tween 80, 2.5 М NaCl, 50% этиленгликоля, pH=7.3 при скорости потока 1 мл/мин. Собирали фракции по 1 мл и анализировали их на активность Фактора VIII (КоА-тест). Объединяли фракции, содержащие Фактор VIII, и, как правило, получали суммарный объем порядка 25 мл.

[0068] Готовили буфер А: 20 мМ имидазол, 10 мМ CaCl₂, 0.02% Tween 80, 1 М глицерин, pH=7.3 и буфер В: 20 мМ имидазол, 10 мМ CaCl₂, 0.02% Tween 80, 1 М глицерин, 1 М NaCl, pH=7.3 для стадии ионного обмена. Уравнивали колонку (1×10 см) Macro-Prep 25Q Support (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США) с помощью 85% буфера А/15% буфера В при скорости потока 2 мл/мин. Пул, собранный в предыдущей стадии, разбавляли в 10 раз буфером А и наносили на колонку с помощью насоса при скорости потока 2 мл/мин. Колонку промывали с помощью 85% буфера А/15% буфера В при скорости потока 2 мл/мин и элюировали Фактор VIII в режиме линейного градиента от 15% буфера В до 70% буфера В объемом 120 мл при скорости потока 2 мл/мин. Собирали фракции по 2 мл и анализировали их на активность Фактора VIII (КоА-тест). Объединяли фракции, содержащие Фактор VIII, и, как правило, получали суммарный объем около 36 мл.

[0069] Пул, полученный на предыдущей стадии, наносили на колонку (2.6×60 см) Superdex 200 prep grade (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Упсала, Швеция), уравнивали и элюировали при скорости 1 мл/мин с помощью 20 мМ имидазола, 10 мМ CaCl₂, 0.02% Tween 80, 1 М глицерина, 150 мМ NaCl, pH=7.3. Собирали фракции по 3 мл и анализировали их на активность Фактора VIII (КоА-тест). Объединяли фракции, содержащие Фактор VIII, и, как правило, получали суммарный объем около 57 мл. Пул, содержащий Фактор VIII, хранили при - 80°C.

[0070] С помощью указанного выше четырехстадийного способа очистки был получен

общий выход примерно 15%, который оценивали по активности КоА, а также в ходе EI-ISA.

[0071] Линия клеток, используемая для получения N8, является рекомбинантной линией клеток яичника китайского хомячка (CHO), стабильно трансфицированных плазмидой экспрессии #814 F8-500 в рTSV7, состоящей из вектора экспрессии рTSV7 со вставкой, содержащей кДНК, кодирующую белок F8-500. Подразумевается, что "N8" в данном описании относится к белку, имеющему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 2. Начиная с N-конца белок F8-500 (N8) состоит из сигнального пептида FVIII (аминокислоты с -19 по -1), за которым следует тяжелая цепь FVIII без В-домена (аминокислоты 1-740), 21-аминокислотный линкер (SFSQNSRHPQNPVVKRHRQR) и легкая цепь FVIII (аминокислоты 1649-2332 человеческого FVIII дикого типа). Последовательность 21-аминокислотного линкера получена из В-домена FVIII и состоит из аминокислот 741-750 и 1638-1648 полноразмерного FVIII.

[0072] Клетки CHO трансфицировали с помощью 814 F8-500 в рTSV7 и производили отбор с помощью дигидрофолатредуктазной системы, что в конечном счете давало клональную суспензию клеток-продуцентов, культивируемых в свободной от животных компонентов среде для выращивания. Производственный цикл начинали с оттаивания виала банка рабочих клеток и наращивания количества клеток с последующим их переносом в производственный биореактор. Такую же среду определенного химического состава, свободную от животных компонентов, применяли на всех стадиях увеличения объема инокулята. После переноса в производственный биореактор в среду добавляли компоненты, которые повышают концентрацию продукта. В производственном биореакторе клетки культивировали в циклическом периодическом процессе с продолжительностью цикла, равной трем дням. При сборе полученного материала 80-90% объема культуры переносили в резервуар для сбора выращенных клеток. Оставшуюся культуральную жидкость затем разбавляли свежей средой, так чтобы получить исходную плотность клеток, и затем начинали новый период культивирования. Собранную порцию материала осветляли в ходе центрифугирования и фильтрации и переносили в резервуар для хранения до начала процесса очистки. К собранному материалу, не содержащему клетки, добавляли буфер в резервуар для хранения с целью стабилизации pH.

Пример 2

ПЭГилирование рекомбинантного Фактора VIII с укороченным и O-гликозилированным В-доменом:

[0073] Молекулы рекомбинантного Фактора VIII, полученные в Примере 1, конъюгировали с полиэтиленгликолем (ПЭГ) по следующему способу:

[0074] Для того чтобы глико-ПЭГилирование молекул рекомбинантного Фактора VIII, полученных в Примере 1, было эффективным, предпочтительно, чтобы концентрация FVIII была >5 мг/мл. Поскольку FVIII в обычных условиях не растворим при такой концентрации, провели скрининг выбранных буферных композиций (см. некоторые из этих результатов в Табл. 1).

[0075] На основании этих данных было обнаружено, что подходящим реакционным буфером является буфер, содержащий 50 мМ MES, 50 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, 20% глицерин, pH 6.0.

[0076]

Таблица 1 Оценка влияния условий реакции на растворимость и агрегацию FVIII
--

	Состав реакционного буфера	Преципитат	% Агрегата
	10 мМ гистидин, 260 мМ глицин, 1% сахара, 10 мМ CaCl ₂	ДА	n.d. (не определено)
	50 мМ HEPES, 10 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, pH 7;	ДА	n.d.
5	50 мМ MES, 10 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, pH 6.0	ДА	n.d.
	50 мМ MES, 50 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, pH 6.0	НЕТ	8
	50 мМ MES, 50 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, 10% глицерин, pH 6.0	НЕТ	5
10	50 мМ MES, 50 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, 20% глицерин, pH 6.0	НЕТ	1.0-1.7

[0077] Рекомбинантный FVIII, очищенный, как описано выше, концентрировали в реакционном буфере либо путем ионного обмена на колонке 50 HQ с применением стадии элюирования, либо на фильтре Sartorius Vivaspin (PES) с отсечкой 10 кДа или на фильтре Amicon 10 кДа MWCO PES до концентрации 6-10 мг/мл. Глико-ПЭГилирование FVIII инициировали путем смешивания Фактора VIII (BDD) (конечная концентрация ~4.7 мг/мл) с сиалидазой (*A. urifaciens*) (159 МЕ/мл), CMP-8SA-глицерин-ПЭГ-40 кДа (5 моль-экв.) и MBP-ST3Gal1 (540 МЕ) в реакционном буфере (50 мМ MES, 50 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, 20% глицерин, 0.5 мМ антипаин, pH 6.0). Реакционную смесь инкубировали при 32°C до достижения степени конверсии ~20-30% от общего.

[0078] После инкубации образец разбавляли буфером А (25 мМ Tris, 5 мМ CaCl₂, 20 мМ NaCl, 20% глицерин, pH 7.5) и наносили на колонку Source 15Q (1 см id (внутренний диаметр) × 6 см, 4.7 мл, 1 мл/мин, 280 нм). Связавшийся материал промывали буфером А и элюировали в режиме ступенчатого градиента буфером В (25 мМ Tris, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, 20% глицерин, pH 7.5). Глико-ПЭГилированный Фактор VIII-(O)-SA-глицерин-ПЭГ-40 кДа элюировался с колонки при ~25% буфера В. На Фиг.2 показана ионообменная хроматография реакционной смеси на колонке Source 15Q.

[0079] Для того чтобы заблокировать свободные остатки галактозы, которые появляются на поверхности N-гликанов при обработке сиалидазой, суммарную фракцию Фактора VIII-SA-глицерин-ПЭГ-40 кДа (конечная концентрация 1.0 мг/мл) смешивали с CMP-SA (2000 моль-экв.) и MBP-SBD-ST3Gal3 (400 МЕ/мл) в реакционном буфере 50 мМ MES, 20 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, 10 мМ MnCl₂, 20% глицерин, pH 6.0 и инкубировали при 32°C в течение 11 часов.

[0080] Полученный глико-ПЭГилированный Фактор VIII-SA-глицерин-ПЭГ-40 кДа с заблокированными группами отделяли от CMP-SA и ST3Gal3 с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 200 (10 см id×300 мм; 280 нм), уравновешенной с помощью 50 мМ MES, 50 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, 10% глицерина, pH 6.0; при скорости 0.25 мл/мин. Продукт - Фактор VIII-SA-глицерин-ПЭГ-40 кДа - элюировался через 38 мин. На Фиг.3 показана очистка продукта с заблокированными группами в ходе эксклюзионной хроматографии с помощью Superdex 200. Фракцию, соответствующую пику, собирали, разделяли на аликвоты и подвергали последующему анализу.

[0081] Целью процедуры блокирования является уменьшение клиренса *in vivo* конъюгированной молекулы Фактора VIII.

Пример 3

Активность O-гликан-ПЭГилированного rFVIII в хромогенном анализе активности FVIII:

[0082] Активность O-глико-ПЭГилированного rFVIII, полученного в Примере 2, оценивали в ходе хромогенного анализа FVIII с помощью реагентов Coatest SP

(Chromogenix) следующим образом: образцы rFVIII и калибратор (7-ой международный стандарт FVIII от NIBSC) разводили в буфере Coatest для анализа (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% BSA, pH 7.3, с консервантом). По пятьдесят мкл образцов, стандартов и отрицательного контроля (буфер) наносили на 96-луночные планшеты для микротитрования (Nunc) в дублях. Смешивали реагент "Фактор IXa/Фактор X", фосфолипидный реагент и CaCl₂ из набора Coatest SP в соотношении 5:1:3 (об.:об.:об.) и добавляли в лунки по 75 мкл полученной смеси. После инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 50 мкл смеси "субстрат Фактора Ха S-2765/ингибитора тромбина 1-2581" и проводили реакцию в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли по 25 мкл 1 М лимонной кислоты, pH 3. Измеряли абсорбцию при 415 нм на ридере планшетов для микротитрования Spectramax (Molecular Devices), с длиной волны сравнения 620 нм. Значение для отрицательного контроля вычитали из значений для всех образцов и строили калибровочную кривую в виде линейной регрессии значений абсорбции, нанесенных против концентрации FVIII. Удельную активность вычисляли путем деления активности образцов на концентрацию белка, определенную с помощью эксклюзионной HPLC путем вычисления площади пика легкой цепи на хроматограмме HPLC, т.е. фрагмент ПЭГ не был включен в расчет. Данные в Табл. 2 показывают, что удельная хромогенная активность сохранялась для О-глико-ПЭГилированных соединений rFVIII, и это означает, что активность Фактора VIII сохранялась в ПЭГилированных вариантах.

Соединение rFVIII	Удельная хромогенная активность (МЕ/мг)
rFVIII	11819±727 (5)
10 кДа-ПЭГ-[O]-rFVIII	Около 8331 (1)
40 кДа-ПЭГ-[O]-rFVIII	9760±886 (8)
80 кДа-ПЭГ-[O]-rFVIII	12129±2643 (3)

Данные представляют средние и стандартные отклонения нескольких независимых определений (их число указано в скобках).

Пример 4

Активность О-гликан-ПЭГилированного rFVIII в анализе свертывающей активности FVIII

[0084] Активность О-глико-ПЭГилированного rFVIII оценивали далее в анализе свертывающей активности FVIII. Образцы rFVIII разводили в HBS/BSA (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4 с 1% BSA) до концентрации примерно 10 Е/мл с последующим 10-кратным разведением в плазме без FVIII, содержащей VWF (Dade Behring). Образцы и стандарт калиброванной плазмы (HemosIL Calibration Plasma, Instrumentation Laboratory) последовательно разводили в HBS/BSA до четырех (образцы) или шести (калибратор) различных концентраций. Время свертывания измеряли на приборе ACL9000 (Instrumentation laboratory) с применением однофакторной программы, где образцы/стандарты смешивали с равными объемами лишенной FVIII плазмы, содержащей VWF (Dade Behring), ионами кальция и реагентами aPTT и определяли время свертывания. В качестве реагентов использовали следующие: Synthasil (HemosIL, Instrumentation Laboratory), Actin FS (Активированный реагент PTT, Dade Behring), Stago (STA® PTT-A, Stago) и dAPTTin (DAPPTIN®TC, Technoclone). Активности образцов вычисляли по графику зависимости в полулогарифмических координатах времени свертывания от концентрации калибратора.

[0085] Свертывающая активность (Фиг.4) соединений О-глико-ПЭГилированного rFVIII (контроль, 10, 40 и 80 кДа ПЭГ соответственно) уменьшалась в различной степени, в зависимости от размера молекулы ПЭГ и применяемых реагентов aPTT. Применение

Synthasil или dAPPTin в качестве реагентов аРТТ приводило к постепенному снижению свертывающей активности с размером ПЭГ. С реагентом аРТТ (Stago) наблюдалась на 50% более низкая удельная свертывающая активность для всех трех оцениваемых О-глико-ПЭГилированных соединений N8. Если в качестве реагента аРТТ применяли Actin FS, удельная свертывающая активность держалась на уровне примерно 10000 МЕ/мг. Эти данные указывают на то, что на ход анализа аРТТ влияет присутствие фрагмента ПЭГ, однако при использовании конкретных реагентов аРТТ, например, Actin FS, удельная свертывающая активность rFVIII не нарушалась при О-глико-ПЭГилировании.

10 Пример 5:

Влияние О-сцепленного ПЭГилирования rFVIII на активность кофактора и на скорость активации FVIII

[0086] Внедрение активированного FVIII в комплекс FIXa-FVIIIa повышает каталитическую эффективность FIXa-катализируемой активации FX на пять порядков по величине (van Dieijen et al. (1981) J Biol Chem 256:3433), и характеристика сборки комплекса FIXa-FVIIIa и кинетики активации FX является чувствительным методом измерения функциональной связности молекул FVIIIa. Активность кофактора тромбин-активированного rFVIII или ПЭГ-rFVIII характеризовали путем определения кинетических параметров FIXa-катализируемой активации FX в присутствии фосфолипидов и тромбин-активируемого rFVIII или ПЭГ-rFVIII. Применяя анализ активности FVIIIa (анализ активности FIXa-кофактора), осуществляли обратное титрование FIXa и FVIIIa против фиксированной концентрации (0.1 нМ) rFVIIIa или FIXa соответственно для получения величины кажущегося сродства FIXa к rFVIIIa ($K_{1/2\text{FIXa}}$) и функциональной концентрации FVIIIa. Были получены константа Михаэлиса (k_m) и скорость каталитической реакции (k_{cat}) активации FX с помощью титрования FX против фиксированной концентрации комплекса FIXa-FVIIIa.

[0087] Определения активности FIXa-кофактора проводили следующим образом. Тромбин-активированные варианты rFVIII и ПЭГ-rFVIII готовили непосредственно перед каждым анализом путем инкубации rFVIII (обычно 0.7 нМ, 1 Е/мл) с 5 нМ человеческого α -тромбина в течение ровно 30 секунд при 37°C. После этого количественно определяли скорость активации FX путем переноса части пробы из описанной выше реакции активации в приготовленную смесь FIXa, фосфолипидных везикул (Phospholipid TGT, Rossix [Мельндаль, Швеция]), гирудина, Pefabloc Xa и CaCl₂; активацию FX инициировали путем добавления FX и проводили реакцию в течение 30 секунд или 60 секунд при 37°C. Активацию останавливали разбавлением реакции активации FX охлажденным на льду буфером, содержащим EDTA. С помощью специфического хромогенного субстрата Fxa проводили количественное определение концентрации Fxa, путем считывания абсорбции при 405 нм на ридере для ELISA. Для перевода единиц абсорбции в концентрацию Fxa использовали стандартную кривую, полученную с помощью очищенного Fxa. Для перевода скорости активации FX в концентрацию rFVIIIa использовали скорость каталитической реакции комплексов FIXa-rFVIIIa, собранных из активированных вариантов rFVIII или ПЭГ-rFVIII.

[0088] Скорость тромбин-катализируемой активации rFVIII измеряли путем подсчета начального (с 0 по 3 мин) образования rFVIIIa в смеси, содержащей 0.7 нМ rFVIII или ПЭГ-rFVIII и 0.13 нМ человеческого α -тромбина. Образование FVIIIa было линейным по времени. Скорость активации FVIIIa выражали в молях rFVIIIa, образовавшихся за минуту на количество молей rFVIII, присутствующего изначально ($v/[rFVIII]_0$).

[0089] О-сцепленное глико-ПЭГилирование rFVIII не влияло на скорость тромбин-катализируемой активации rFVIII или на k_m или k_{cat} FIXa-катализируемой активации FX в присутствии активированного rFVIII (см. Табл. 3). Более того, О-сцепленное глико-ПЭГилирование не влияло на кажущуюся K_d взаимодействия rFVIIIa-FIXa ($K_{1/2FIXa}$).

[0090] На Фиг.4 показана свертывающая активность О-глико-ПЭГилированного rFVIII, определенная с помощью различных реагентов aPTT.

Данные приведены в виде соотношения между свертывающей активностью и хромогенной активностью (А) или в виде удельной свертывающей активности (В). Показаны значения средних и стандартных отклонений трех независимых экспериментов.

[0091]

Таблица 3 Скорость активации rFVIII и кинетические константы активации FX под действием FIXa				
Молекула FVIII	Скорость активации FVIII		Активация FX	
	$10^{-3} \times \text{мин}^{-1}$	$K_{1/2FIXa}$	K_m	k_{cat}
rFVIII	10.4±1.9	нМ	нМ	C^{-1}
40К-ПЭГ-[O]-rFVIII	9.9±3.8	0.88±0.46	7.9±1.7	4.5±1.9
80К-ПЭГ-[O]-rFVIII	9.8±3.4	0.42±0.02	6.4±0.8	4.7±0.2
		1.11±0.12	8.2±0.6	3.7±0.4

Данные представляют средние и стандартные отклонения 3-6 измерений.

Пример 6

Фармакокинетика глико-ПЭГилированного FVIII с делецией В-домена (BDD) в нокаутированных по FVIII мышцах (FVIII KO) и нокаутированных по vWF мышцах (vWF KO)

[0092] Была изучена кинетика глико-ПЭГилированного BDD-FVIII с различным размером ПЭГ после внутривенного введения 280 МЕ/кг мышцам FVIII KO.

[0093] Были изучены следующие соединения: BDD-FVIII, BDD-FVIII - 10К ПЭГ (О-гликан, 0129-0000-1005), BDD-FVIII - 40К ПЭГ (О-гликан, 0129-0000-1003), BDD-FVIII-2×40К ПЭГ (О- и М-гликан 0129-0000-1008-1A), BDD-FVIII - 80К ПЭГ (N-гликан, 0129-0000-1012, О-гликан 0129-0000-1009).

Схема экспериментов на животных:

[0094] Мышей, нокаутированных по гену Фактора VIII (FVIII KO), разводили в компании Taconic M&V. Данная линия получена удалением 16 экзона у мышей C57Bl/6. Опыты проводили на смеси самцов и самок (ок. 1:1) с приблизительным весом 25 г, в возрастном диапазоне 19-26 недель. Полное обратное скрещивание мышей не проводилось. В этой линии мышей не детектировался FVIII.

[0095] Мышам проводили однократные внутривенные инъекции в хвостовую вену 280 МЕ/кг перечисленных выше соединений. Если инъекция происходила рядом с веной, эту мышь заменяли другой мышью. После введения дозы получали образцы крови из глазного синуса начиная с момента «перед дозированием» и вплоть до 64 часов после дозирования с помощью непокрытых стеклянных капилляров. От каждой мыши брали по три образца, и в каждый момент времени собирали по 2, 3 или 4 образца. Кровь стабилизировали в цитрате натрия (9:1) и разводили в буфере FVIII COA SP (1:4), после чего центрифугировали 5 мин при 4000 g. Плазму, полученную из разбавленной крови, замораживали на сухом льду и хранили при -80°C перед количественным определением (анализ хромогенной активности FVIII и/или анализ антигена FVIII).

Количественный анализ плазмы

[0096] Хромогенную активность FVIII определяли с помощью реагентов из набора

Coatest SP (Chromogenix). По 50 мкл разведенных образцов плазмы и калибраторов (калибровочная плазма ILS) в буфере Coatest SP, а также отрицательного контроля (чистый буфер) наносили на 96-луночные планшеты для микротитрования (Nunc) в дублях. Смешивали реагент "Фактор IXa/Фактор X", фосфолипидный реагент и CaCl₂

из набора Coatest SP в соотношении 5:1:3 (об.:об.:об.) и добавляли в лунки по 75 мкл этой смеси. Через 15 мин инкубации при комнатной температуре добавляли 50 мкл смеси "субстрат Фактора Ха S-2765/ингибитор тромбина 1-2581" и проводили реакцию в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 25 мкл 2% лимонной кислоты. Измеряли абсорбцию при 405 нм на ридере планшетов для микротитрования Spectramax (Molecular Devices). Активность FVIII в образцах плазмы рассчитывали по калибровочной кривой, полученной с помощью разведения калиброванного международного стандарта плазмы (ILS).

[0097] Анализ антигена FVIII проводили с помощью коммерчески доступного набора ELISA Asserachrom VIII:CAg (Diagnostica Stago), с применением двух моноклональных антител, направленных к легкой цепи человеческого FVIII. Калибраторы (разведения соединений) или образцы плазмы, разбавленные по меньшей мере в 50 раз в буфере для разведения Coatest SP, имеющегося в наборе, наносили на планшет с предварительно покрытыми лунками и проводили ELISA согласно инструкциям производителя. Величины, использованные в отчете о результатах фармакокинетического исследования, получены по стандартной кривой, построенной с помощью самих соединений.

Оценка фармакокинетических параметров:

[0098] Фармакокинетический анализ данных проводили некомпартментными способами (NCA), с применением ILS в качестве калибратора (данные основаны на хромогенной активности), с помощью самих соединений в качестве калибратора (данные основаны на ELISA). По этим данным оценивали следующие параметры: C_{max} (максимальная концентрация; соответствует забору крови в первый момент времени после внутривенного введения), T_{max} (время максимальной концентрации; соответствует первому моменту времени после внутривенного введения это забор пробы), AUC_{0-∞} (площадь под кривой от времени t=0 до бесконечности), T_{1/2} (конечный период полувыведения), CL (клиренс) и V_{ss} (объем распределения в стабильном состоянии).

Все расчеты были сделаны с помощью WinNonlin Pro, версия 4.1.

[0099] После внутривенной инъекции 280 МЕ/кг BDD-FVIII, BDD-FVIII-10 кДа ПЭГ, BDD-FVIII - 40 кДа ПЭГ, BDD-FVIII-2×40 кДа ПЭГ и BDD-FVIII-60 кДа ПЭГ мышам FVIII КО время полужизни возрастало с увеличением размера ПЭГ в интервале от 7.8 ч (BDD-FVIII) до 15-16 ч (Табл. 4), что соответствует двукратному увеличению. Аналогично, снижался клиренс (CL), а среднее время удерживания (MRT) возрастало с увеличением размера ПЭГ (Табл. 4).

[0100]

Таблица 4 Оценка фармакокинетических параметров FVIII, глико-ПЭГилированного с помощью ПЭГ различного размера, после внутривенного введения мышам FVIII КО на основании данных по хромогенной активности (BDD:с делецией В-домена)					
Соединение	Доза (МЕ/кг)	T _{1/2} , (ч)	CL (мл/ч/кг)	MRT(4)	Пролонгация (кратность)
BDD-FVIII	280	6.7-9.3	8.1-10	9.9-11	1
BDD-FVIII 10 кДа ПЭГ (О-гликан)	280	10	8.5	16	1.3
BDD-FVIII-2×40 кДа ПЭГ	280	13	5.8	19	1.9-2.1
BDD-FVIII 40 кДа ПЭГ (О-гликан)	280	15-16	3.6-3.8	20-22	1.7
BDD-FVIII 80 кДа ПЭГ	280	15	6.4	21	1.9

(О-гликан)

Вывод:

[0101] Глико-ПЭГилование BDD-FVIII увеличивало $T_{1/2}$ в 1.3-2.1 раза по сравнению с BDD-FVIII после внутривенного введения 280 МЕ/кг мышам FVIII КО. Увеличение $T_{1/2}$ наблюдалось по мере увеличения размера ПЭГ-группы, в интервале от 10 кДа до 80кДа ПЭГ.

Пример 7

[0102] Пролонгированный гемостатический эффект 40К-ПЭГ-[О]-N8, по сравнению с Advate, в модели $FeCl_3$ -индуцированного повреждения у мышей с гемофилией А.

[0103] Исследовали продолжительность действия 40К-ПЭГ-[О]-N8, по сравнению с рекомбинантным FVIII (Advate) в модели $FeCl_3$ -индуцированного повреждения у мышей с гемофилией А (F8-КО).

[0104] Мышей анестезировали и помещали на грелку-матрац (37°C) для поддержания температуры тела. Освобождали сонную артерию и помещали вокруг нее датчик потока (0.5 PSB Nanoprobe), который измеряет кровоток по ультразвуку. Индуцировали повреждение (химическое окисление, опосредованное ионами железа) путем аппликации фильтровальной бумаги (2×5 мм), свежесмоченной в 10% растворе $FeCl_3$ вокруг высвобожденной сонной артерии. Фильтровальную бумагу удаляли через 3 мин. Затем артерию промывали три раза с помощью 0.9% NaCl и, наконец, применяли Surgilube (акустический соединитель) для вытеснения воздуха из датчика потока, чтобы обеспечить оптимальное измерение тока крови. Кровоток (мл/мин) записывали в течение 25 мин после удаления фильтровальной бумаги, пропитанной $FeCl_3$, и определяли время окклюзии путем измерения времени (в мин) от удаления фильтровальной бумаги, пропитанной $FeCl_3$, до тех пор, пока кровоток не становился равным 0 мл/мин. Если окклюзия не происходила по истечении 25 мин, время окклюзии все равно считали равным 25 мин, даже если окклюзия не происходила в течение всего наблюдаемого периода. Мышам F8-КО (n=6-10) вводили Advate (280 Е/кг), 40К-ПЭГ-[О]-M8 (280 Е/кг) или растворитель. Повреждение, индуцируемое $FeCl_3$, осуществляли через 5 мин (немедленное действие) или через 24, 48, 60 и 72 часа после дозирования. Кровоток (мл/мин) записывали в течение 25 мин после удаления $FeCl_3$, после чего определяли время окклюзии.

[0105] Закупорка не происходила у мышей F8-КО, которым вводили раствор, в то время как окклюзия произошла у всех мышей, которым вводили 40 кДа-ПЭГ-[О]-M8 или Advate, через 5 мин после введения дозы (немедленное действие) со средним временем окклюзии 4.3±0.4 мин и 5.2±0.7 мин соответственно. У мышей F8-КО, которым вводили 40 кДа-ПЭГ-[О]-M8, среднее время окклюзии возрастало до 13.8±3.4 мин через 72 часа после введения дозы. В отличие от этого у мышей F8-КО, которым вводили Advate, время окклюзии составило 13.0±3.4 мин и 15.9±2.9 мин через 24 и 48 часов соответственно. Важно подчеркнуть, что окклюзия не наблюдалась через 60 и 72 часа после введения Advate. Окклюзия происходила у всех мышей, которым вводили 40 кДа-ПЭГ-[О]-M8, через 24 часа после введения дозы, в то время как окклюзия наблюдалась только у 67% мышей, которым вводили Advate. Через 72 часа окклюзия все еще наблюдалась у 63% мышей, которым вводили 40 кДа-ПЭГ-[О]-N8, в то время как окклюзия не наблюдалась через 60 и 72 часа после введения Advate.

Длительный эффект 40 кДа-ПЭГ-[О]-N8 у мышей F8-КО.

[0106] Осуществляли $FeCl_3$ -индуцируемое повреждение через 5 мин (немедленное

действие), 24, 48, 60 и 72 часов после введения дозы 280 МЕ/кг 40 кДа-ПЭГ-[О]-N8, 280 МЕ/кг Advate или растворителя. Кровоток (мл/мин) записывали в течение 25 мин после удаления FeCl₃, после чего определяли время до наступления окклюзии. Через 60 и 72 часа после дозирования не происходила окклюзия у мышей, которым вводили Advate.
 5 Показаны средние и SEM 6-10 мышей на группу. Значения времени до окклюзии между различными группами сравнивали с помощью теста Краскела-Уоллиса, включая критерий Данна (Dunn's post test). *:p<0.05; **:p<0.01.

[0107] В заключение, 40 кДа-ПЭГ-[О]-N8 обладает существенно более длительным гемостатическим эффектом, по сравнению с Advate, в модели FeCl₃-индуцируемого
 10 повреждения на мышах F8-КО.

Формула изобретения

1. Молекула предшественника Фактора VIII с укороченным В-доменом, имеющая увеличенное время полужизни в кровотоке, где В-домен соответствует аминокислотам
 15 741-761 из SEQ ID NO 2, причем указанная молекула ковалентно конъюгирована с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или полисахаридом размером 10-80 кДа посредством О-связанного олигосахарида по сериновому остатку в укороченном В-домene, который соответствует аминокислоте 750 в SEQ ID NO 2.

2. Молекула предшественника Фактора VIII с укороченным В-доменом, имеющая увеличенное время полужизни в кровотоке, имеющая аминокислотную
 20 последовательность, представленную в SEQ ID NO 2, причем указанная молекула ковалентно конъюгирована с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или полисахаридом размером 10-80 кДа посредством О-связанного олигосахарида по сериновому остатку в положении 750 в SEQ ID NO 2.

3. Молекула по любому из пп. 1-2, где размер ПЭГ или полисахарида составляет
 25 около 40000 Да.

4. Фармацевтическая композиция для лечения гемофилии, включающая молекулу по любому из пп. 1-3 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый эксципиент.

5. Способ получения молекулы согласно любому из пп. 1-3, включающий
 30 (а) трансфекцию подходящей клетки-хозяина вектором, кодирующим белковую молекулу по любому из пп. 1-3,

(б) культивирование клетки-хозяина со стадии (а) в условиях, пригодных для экспрессии Фактора VIII в клетке-хозяине,

35 (в) сбор Фактора VIII из культуры клетки-хозяина согласно стадии (б), и

(г) ковалентную конъюгацию молекулы предшественника Фактора VIII с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или полисахаридом размером 10-80 кДа посредством О-связанного олигосахарида по сериновому остатку в укороченном В-домene, который соответствует аминокислоте 750 в SEQ ID NO 2.

40 6. Применение молекулы по любому из пп. 1-3 в качестве лекарства для лечения гемофилии.

7. Применение по п. 6 для лечения гемофилии путем подкожного введения.

8. Применение по п. 6 для лечения гемофилии путем внутривенного введения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novo Nordisk A/S
 DeFrees, Shawn
 <120> Conjugated Factor VIII Molecules
 <130> 101961-5191wo
 <140>
 <141> 2009-02-25
 <150> US 61/032,006
 <151> 2008-02-27
 <150> US 61/043,354
 <151> 2008-04-08
 <150> US 61/058,869
 <151> 2008-06-04
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15
 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95
 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125
 Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
 740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960

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

Gln Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
 1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
 1235 1240 1245

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
 1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
 1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
 1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr
 1295 1300 1305

Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu
 1310 1315 1320

Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr
 1325 1330 1335

Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
 1340 1345 1350

Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
 1355 1360 1365

Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala
 1370 1375 1380

Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
 1385 1390 1395

Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
 1400 1405 1410

Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
 1415 1420 1425

Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu
 1430 1435 1440

Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
 1445 1450 1455

Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
 1460 1465 1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
 1475 1480 1485

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
 1490 1495 1500

Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
 1505 1510 1515

Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
 1520 1525 1530

Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
 1535 1540 1545

Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
 1550 1555 1560

Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
 1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
 1580 1585 1590

Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
 1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
 1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln
 1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
 1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
 1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
 1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
 1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
 1700 1705 1710

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
 1715 1720 1725

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
 1730 1735 1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
 1745 1750 1755

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
 1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
 1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
 1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
 1820 1825 1830

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
 1835 1840 1845

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
 1850 1855 1860

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
 1865 1870 1875

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
 1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
 1910 1915 1920

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
 1925 1930 1935

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
 1940 1945 1950

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
 1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
 1970 1975 1980

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
 1985 1990 1995

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
 2000 2005 2010

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
 2015 2020 2025

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
 2030 2035 2040

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
 2045 2050 2055

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
 2060 2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
 2075 2080 2085

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
 2090 2095 2100

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
 2105 2110 2115

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
 2120 2125 2130

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
 2135 2140 2145

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
 2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
 2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
 2180 2185 2190

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 2195 2200 2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
 2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
 2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
 2240 2245 2250
 Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
 2255 2260 2265
 His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 2270 2275 2280
 Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
 2285 2290 2295
 Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
 2300 2305 2310
 Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
 2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 2
 <211> 1445
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> B-domain truncated human Factor VIII

<400> 2

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10
 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95
 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670

Страница

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn
 740 745 750

Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
 755 760 765

Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 770 775 780

Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
 785 790 795 800

Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
 805 810 815

Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg
 820 825 830

Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe
 835 840 845

Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 850 855 860

Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
 865 870 875 880

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 885 890 895

Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 900 905 910

Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr
 915 920 925

Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp
 930 935 940

Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
 945 950 955 960

His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
 965 970 975

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
 980 985 990

Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met
 995 1000 1005

Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro
 1010 1015 1020

Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile
 1025 1030 1035

Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile
 1040 1045 1050

Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser
 1055 1060 1065

Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu
 1070 1075 1080

Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr
 1085 1090 1095

Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
 1100 1105 1110

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu
 1115 1120 1125

Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly
 1130 1135 1140

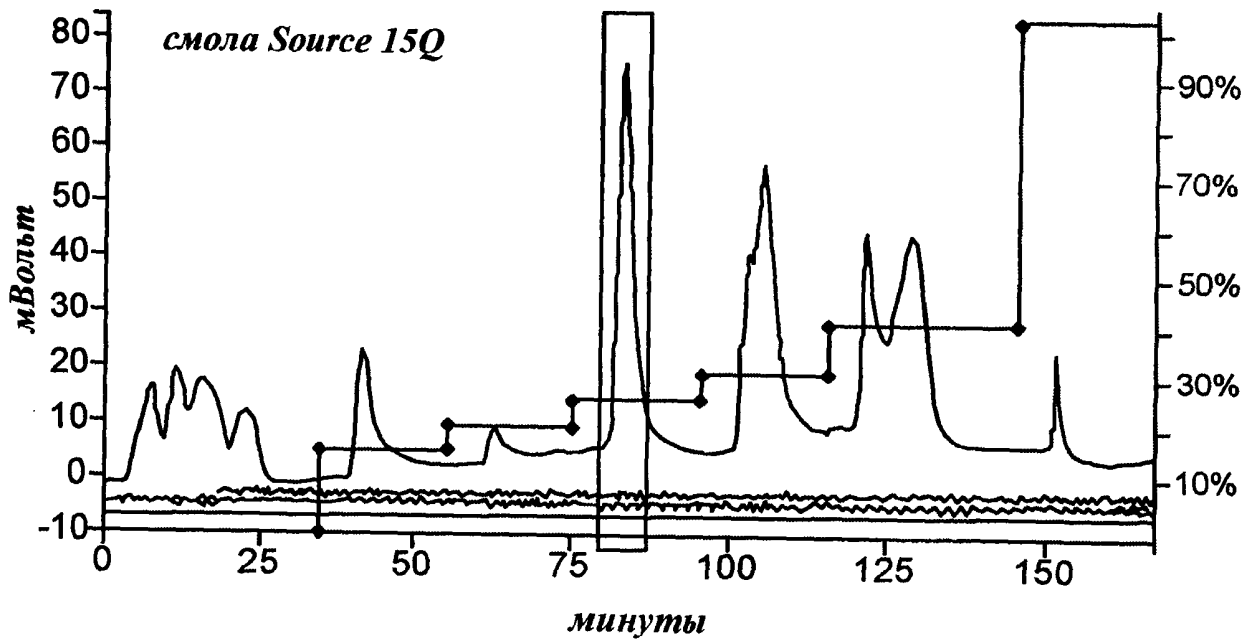
His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln
 1145 1150 1155

Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn
 1160 1165 1170

Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu
 1175 1180 1185

Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg
 1190 1195 1200

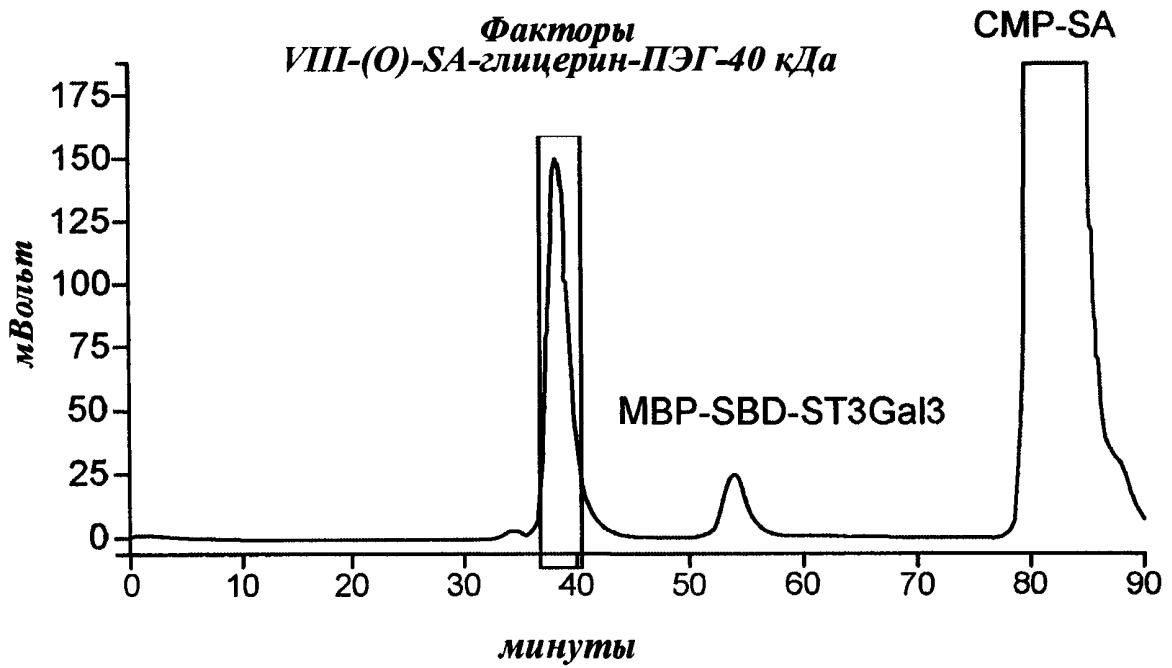
Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
 1205 1210 1215
 Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
 1220 1225 1230
 Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
 1235 1240 1245
 Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg
 1250 1255 1260
 Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu
 1265 1270 1275
 Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met
 1280 1285 1290
 Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala ser ser Tyr
 1295 1300 1305
 Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
 1310 1315 1320
 His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn
 1325 1330 1335
 Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
 1340 1345 1350
 Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met
 1355 1360 1365
 Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
 1370 1375 1380
 Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
 1385 1390 1395
 Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro
 1400 1405 1410
 Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
 1415 1420 1425
 Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp
 1430 1435 1440
 Leu Tyr
 1445



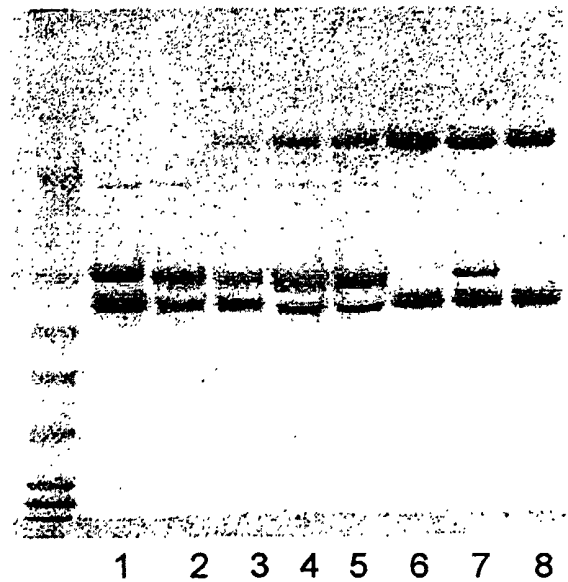
фракция продукта



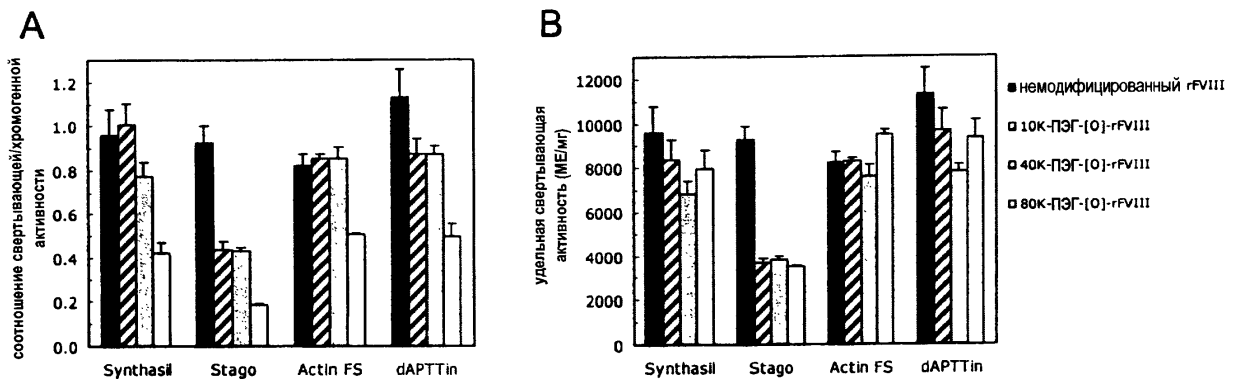
Фиг. 2



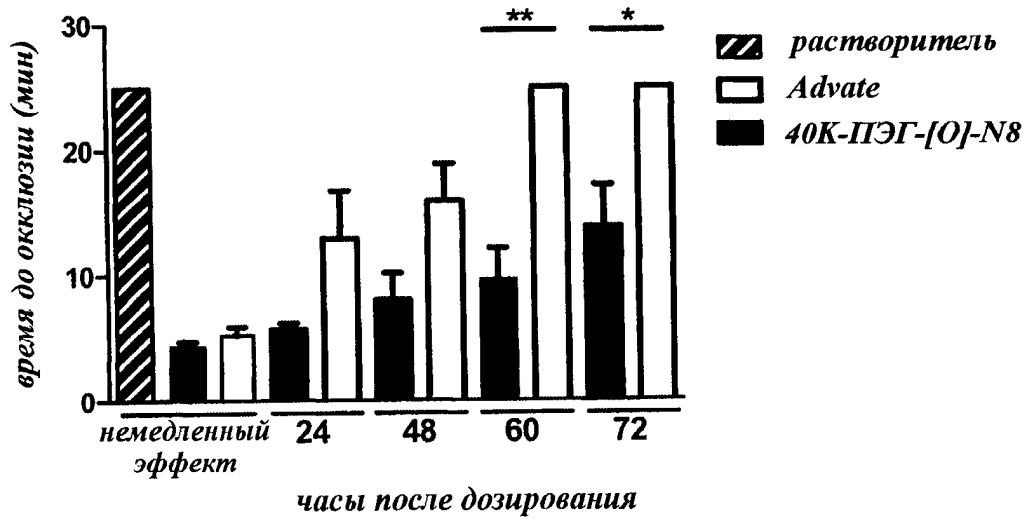
- Дорожка 1; Фактор VIII (концентрированный)
- Дорожка 2; глико-ПЭГилирование, 0 ч.
- Дорожка 3; глико-ПЭГилирование, 30 ч.
- Дорожка 4; глико-ПЭГилирование, 43 ч.
- Дорожка 5; глико-ПЭГилирование, 49 ч.
- Дорожка 6; продукт, полученный на Source 15Q
- Дорожка 7; реакция блокирования (11 ч)
- Дорожка 8; продукт, очищенный на Superdex 200



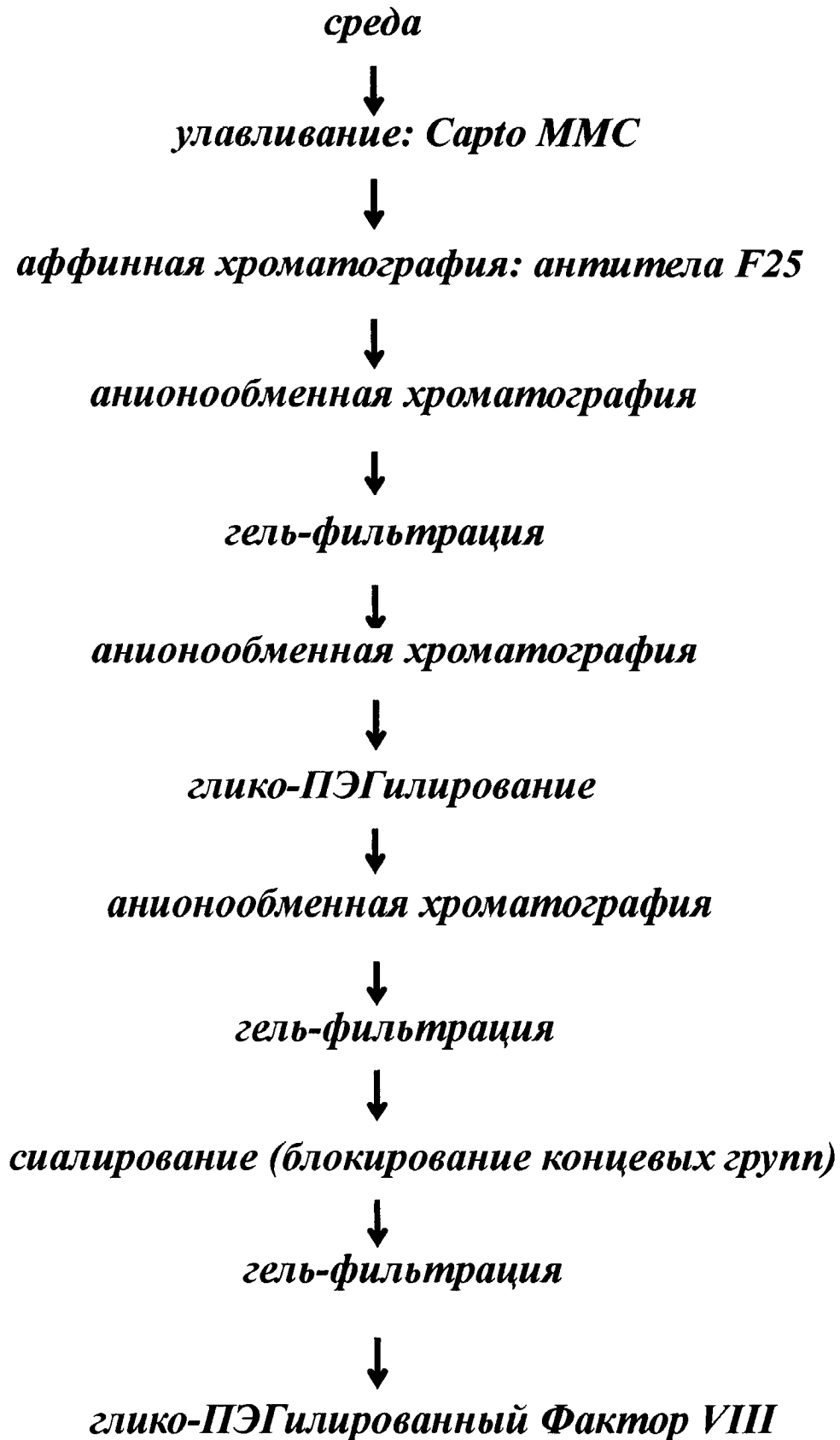
Фиг. 3



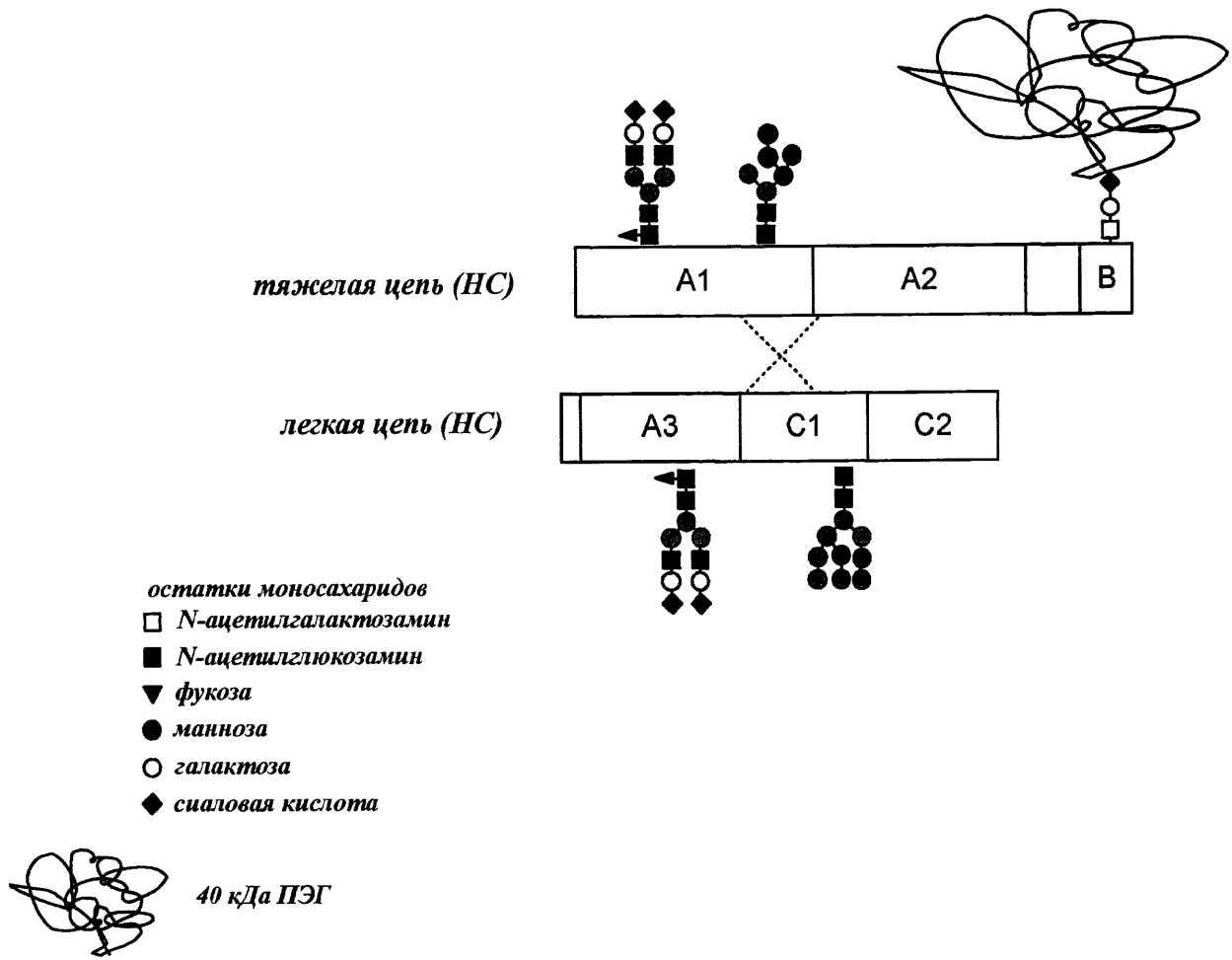
Фиг. 4



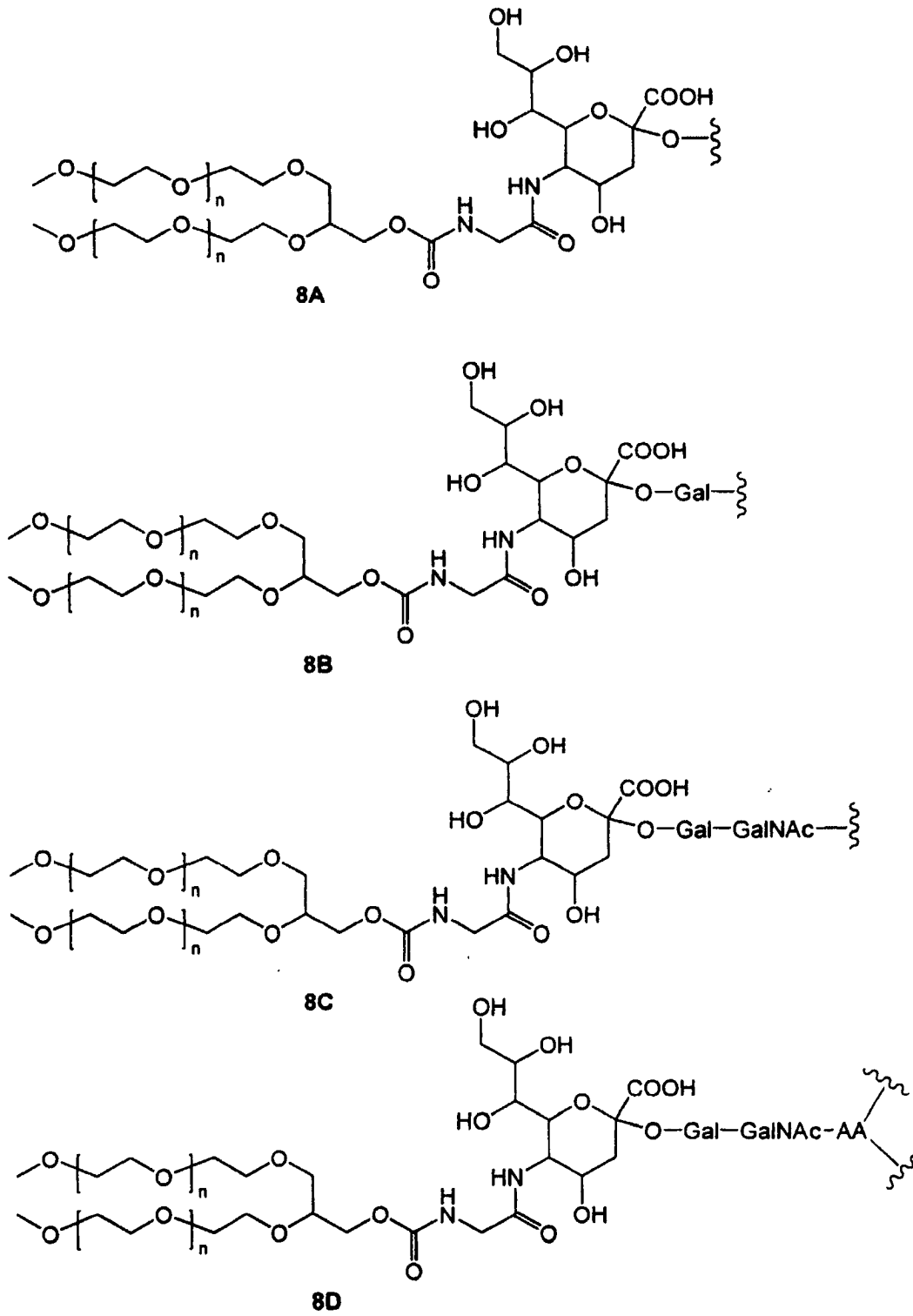
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



$n > 400$ (например ~ 455); $n > 900$ (например ~ 910)

Фиг. 8