



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95225 (13) C2

(51) МПК

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) МОДИФІКОВАНИЙ ПОЛІМЕРОМ ФАКТОР VIII ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГЕМОФІЛІЇ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ**

1

2

(21) а200706559

(22) 14.11.2005

(24) 25.07.2011

(86) PCT/US2005/041205, 14.11.2005

(31) 60/627,277

(32) 12.11.2004

(33) US

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ПАН КЛАРК КЮ., US, МЬОРФІ ДЖОН Е., US, МЕІ БАЙСОНГ, СА/US, СТРАУСС ДЖОНАТАН С., US, ТДЖАНДРА ХЕНДРІ, ІД/US, ЧЕН ДЖІАНМІН, US, БАРНЕТТ ТОМАС, US, ТАНГ ЛІАНГ, US, ВАНГ ДЕКІАН, US

(73) БАЙЕР ХЕЛСКЕР ЛЛС, US

(56) WO 97/11957 A, 03.04.1997

US 6 753 165 A, 22.06.04

SAKURAGAWA N. ET AL.: 'Studies on the Stability of Factor VIII modified by Polyethylene Glycol', ACTA MEDICA ET BIOLOGICA vol. 36, no. 1, 1988, pages 1 - 6

(57) 1. Кон'югат, що має прокоагулянтну активність фактора VIII, який включає функціональний поліпептид фактора VIII, який мутований таким чином, що принаймні один нецистеїновий залишок заміщений на цистеїновий залишок, так що присутній мутантний цистеїновий залишок, де функціональний поліпептид фактора VIII ковалентно з'єднаний на мутантному цистеїновому залишку з біосумісним полімером.

2. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер включає поліетиленгліколь.

3. Кон'югат за п. 2, де поліетиленгліколь включає метоксиполіетиленгліколь.

4. Кон'югат за п. 3, де метоксиполіетиленгліколь має розмір в інтервалі від 5 кДа до 64 кДа.

5. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду фактора VIII на амінокислотному залишку, що знаходиться на відстані або в межах 20 ангстрем від (а) сайту зв'язування рецептора виведення фактора VIII, (б) сайту зв'язування протеази, здатної деградувати фактор VIII, і/або (с) сайту зв'язування інгібіторних антитіл до фактора VIII.

6. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду

фактора VIII на амінокислотному залишку, в інтервалі залишків 484-509 або 1811-1818, включаючи початкові та кінцеві точки, або на амінокислотному залишку, що знаходиться на відстані 20 ангстрем від одного з положень амінокислот інтервала 484-509 або 1811-1818, включаючи початкові та кінцеві точки.

7. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному з положень амінокислот 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 і 2284 фактора VIII.

8. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду при амінокислотному залишку 1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803 або 1804 фактора VIII.

9. Кон'югат за п. 1, де функціональний поліпептид фактора VIII є фактором VIII з делетованим В-доменом.

10. Кон'югат за п. 9, де біосумісний полімер ковалентно приєднаний до фактора VIII з делетованим В-доменом у положеннях амінокислот 129, 491, 1804 і/або 1808.

11. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер приєднаний до поліпептиду у положенні амінокислоти 1804 і включає поліетиленгліколь.

12. Кон'югат за будь-яким з пп. 1-11, де біосумісний полімер є поліетиленгліколем.

13. Спосіб одержання кон'югата за п. 1, що включає:

мутацію нуклеотидної послідовності, що кодує функціональний поліпептид фактора VIII, для заміщення кодуєчої послідовності нецистеїнового залишку на кодуєчу послідовність цистеїнового залишку;

експресію мутованої нуклеотидної послідовності, щоб отримати модифікований цистеїном мутеїн;

очищення мутеїну;

реагування мутеїну з біосумісним полімером, де біосумісний полімер має сульфгідрильний реакційний фрагмент, такий як тіол, трифлат, трезилат, азіридин, оксиран, S-піридил або малеїмід, що реагує з поліпептидом при введеному цистеїновому залишку з утворенням кон'югата; і

(13) C2

(11) 95225

(19) UA

очищення кон'югата.

14. Спосіб за п. 13, у якому біосумісний полімер включає поліетиленгліколь.

15. Спосіб за п. 14, у якому мутеїн реагує з малеїмідною групою на поліетиленгліколі.

16. Спосіб за п. 13, у якому біосумісний полімер є поліетиленгліколем, та експресія мутованої нуклеотидної послідовності відбувається у середовищі культивування клітин, яке містить сульфгідрильні групи, які приєднуються до введеної вільної цистеїнової групи (груп) на модифікованому цистеїновому мутеїні, та спосіб окрім того включає наступні стадії після експресії мутеїну і до очищення мутеїну:

(а) контактування мутеїну з відновлювачем при умовах, у яких мутеїн м'яко відновлюється та відокремлюється сульфгідрильна група; і

(б) вилучення сульфгідрильної групи, що відокремилася, та відновлювача із мутеїну, де мутеїн окрім того реагує із поліетиленгліколем протягом принаймні п'яти хвилин після видалення відновлювача.

17. Спосіб за п. 16, у якому сульфгідрильну групу, що відокремилася, і відновлювач видаляють із мутеїну за допомогою витиснювальної за розміром молекул або іонообмінної хроматографії.

18. Спосіб за п. 16, у якому мутеїн фактора VIII є мутеїном фактора VIII з делетованим В-доменом.

19. Спосіб за п. 16, у якому поліетиленгліколь є ПЕГ-малеїмідом та має розмір в інтервалі від 5 кДа до 64 кДа.

20. Фармацевтична композиція для парентерального введення, що містить терапевтично ефективну кількість кон'югата за п. 1 та фармацевтично прийнятний ад'ювант.

21. Застосування кон'югата за пп. 1-12 для одержання лікарського засобу для лікування гемофілії.

22. Застосування фармацевтичної композиції за п. 20 для одержання лікарського засобу для лікування гемофілії.

23. Кон'югат за п. 1, де біосумісний полімер являє собою гідроксіетил-крохмаль.

24. Кон'югат за п. 23, де гідроксіетил-крохмаль ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному або більше амінокислотних положеннях 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1911, 2091, 2118 і 2284 фактора VIII.

25. Кон'югат за пп. 23 або 24, де функціональний поліпептид фактора VIII є фактором VIII з делетованим В-доменом.

26. Кон'югат за п. 25, де гідроксіетил-крохмаль ковалентно приєднаний до фактора VIII з делетованим В-доменом у положеннях амінокислоти 129, 491, 1804 і/або 1808.

27. Кон'югат за п. 23, де гідроксіетил-крохмаль приєднаний до поліпептиду у положенні амінокислоти 1804 фактора VIII.

28. Кон'югат за п. 23, де гідроксіетил-крохмаль приєднаний до поліпептиду у положенні амінокислоти 1804 фактора VIII, та функціональний поліпептид фактора VIII є фактором VIII з делетованим В-доменом.

29. Спосіб одержання кон'югата за п. 23, що включає:

вибір специфічної амінокислоти, що не є цистеїновим залишком в амінокислотній послідовності функціонального поліпептиду фактора VIII, яка є попередньо заданим сайтом приєднання гідроксіетил-крохмалю;

мутацію нуклеотидної послідовності, що кодує функціональний поліпептид фактора VIII, для заміщення кодуючої послідовності нецистеїнового амінокислотного залишку кодуючою послідовністю цистеїнового залишку в попередньо заданому сайті;

експресію мутованої нуклеотидної послідовності, щоб отримати модифікований цистеїном мутеїн;

очищення мутеїну;

реагування мутеїну з гідроксіетил-крохмалем, який активований для реакції з поліпептидами по суті тільки з відновленими цистеїновими залишками, так що утворюється кон'югат; і

очищення кон'югата.

30. Спосіб за п. 29, у якому гідроксіетил-крохмаль активують додаванням малеїмідної групи, яка може специфічно реагувати із цистеїнами в протеїнах.

31. Фармацевтична композиція для парентерального введення, яка містить терапевтично ефективну кількість кон'югата за п. 23 і фармацевтично прийнятний ад'ювант.

32. Спосіб лікування гемофілії, що передбачає введення пацієнтові, який потребує цього, ефективної кількості композиції за п. 31.

33. Застосування кон'югата за одним з пп. 23-28 для одержання лікарського засобу для лікування гемофілії.

Перехресне посилання

Ця заявка має перевагу пріоритету за заявкою № 60/627,277 на патент США, поданою 12 листопада 2004 р., яку повністю включено сюди шляхом посилання.

Галузь винаходу

Цей винахід стосується мутеїнів Фактора VIII (FVIII), які мають можливість зв'язуватися в попередньо заданому сайті з одним або більше біосумісними полімерами, такими як поліетиленгліколь. Крім того, пропонуються засновані на них склади,

дозування та способи їх введення з терапевтичною метою. Ці модифіковані варіанти FVIII і засновані на них композиції та способи придатні для вибору методу лікування осіб, уражених гемофілією А, у якому частоту введення препарату зменшено та імуногенну відповідь знижено.

Рівень техніки

Гемофілія А є найбільш поширеним спадковим порушенням згортання крові з оцінкою трапляння: одне на 5000 чоловіків. Вона спричиняється дефіцитом або структурними дефектами FVIII, основ-

ному компоненті природного шляху згортання крові. Сучасне лікування гемофілії А включає внутрішньовенне введення людського FVIII. Людський FVIII отримують рекомбінантним методом у вигляді одноланцюжкової молекули розміром приблизно 300 кДа. Вона складається зі структурних доменів A1-A2-B-A3-C1-C2 (Thompson, 2003, *Semin. Hematol.* 29, pp. 11-22). Продукт-попередник перетворюється на два поліпептидні ланцюжки розмірами 200 кДа (важкий) і 80 кДа (легкий) в апараті Гольджі, при цьому два ланцюжки утримуються разом за допомогою іонів металів (Kaufman et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263, p. 6352; Andersson et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, p. 2979).

Домен В мутеїну FVIII вважається необов'язковим, оскільки FVIII з делетованим доменом В (BDD, A1-A2-важкий ланцюг 90 кДа плюс легкий ланцюг 80 кДа) також проявляє ефективність при замісній терапії гемофілії А. Послідовність FVIII з делетованим В-доменом містить делецію всіх, крім 14-ти, амінокислот В-домену.

Пацієнтів з гемофілією А зараз лікують внутрішньовенним введенням FVIII у разі необхідності або шляхом профілактичної терапії, яку призначають кілька разів на тиждень. При профілактичному лікуванні вводять 15-25 МО фактора VIII на 1 кг ваги тіла три рази на тиждень. Це постійно потрібно пацієнтові. Через короткий час напіввиведення у людини, FVIII повинен вводитися часто. Незважаючи на великий розмір у понад 300 кДа протеїну повної довжини, FVIII має у людей період напіввиведення тільки близько 11 годин (Ewenstein et al., 2004, *Semin. Hematol.* 41, pp. 1-16). Необхідність частого внутрішньовенного введення створює величезні бар'єри в дотриманні хворими режиму та схеми лікування. Для пацієнтів було б більш зручним, якби був розроблений FVIII-продукт, що має більш тривалий період напіввиведення і, отже, вимагає менш частого введення. Крім того, якби період напіввиведення був збільшений, могла б бути зменшена вартість лікування, оскільки в результаті могла б знадобитися менша кількість доз.

Додатковим недоліком існуючої терапії є те, що приблизно у 25-30% пацієнтів виробляються антитіла, які інгібують активність FVIII (Saenko et al., 2002, *Haemophilia* 8, pp. 1-11). Головні епітопи інгібаторних антитіл локалізовані всередині домену A2 на залишках 484-508, домену A3 на залишках 1811-1818 і домену C2. Вироблення антитіл перешкоджає використанню FVIII при замісній терапії, змушуючи цю групу пацієнтів шукати ще більш дороге лікування за допомогою високодозувально-го рекомбінантного Фактора VIII і імунотійкої терапії.

У подальших дослідженнях були ідентифіковані FVIII-епітопи інгібаторних антитіл. При дослідженні 25-ти інгібаторних зразків плазми було виявлено, що 11 з них пов'язані із фрагментом A3C1C2, що викликаний тромбіном і має легкий ланцюг розміром 73 кДа, 4 зв'язані з доменом A2, а 10 - з обома фрагментами (Fulcher, C. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2(22), pp. 7728-32). В іншому дослідженні шість із восьми інгібаторів домену A2 пацієнтів були нейтралізовані рекомбінантним A2-поліпептидом (Scandella, D. et al., 1993,

*Blood* 82(6), pp. 1767-75). Епітопи для шести з дев'яти інгібаторів пацієнтів виявлені на залишках 379-538 домену A2 (Scandella, D. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85(16), pp. 6152-6). Епітоп для 18-ти інгібаторів з важким ланцюгом був визначений у тій самій N-кінцевій області розміром 18,3 кДа домену A2 (Scandella, D. et al., 1989, *Blood* 74(5), pp. 1618-26).

Активна рекомбінантна гібридна молекула людина/свиня мутеїну FVIII, отримана заміщенням залишків 387-604 домену A2 людини гомологічною послідовністю свині, виявляла стійкість до інгібітору A2 пацієнта (Lubin, I. et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269(12), pp. 8639-41) і стійкість до мишачого моноклонального антитіла mAB 413 IgG, що конкурує з інгібіторами A2 пацієнта у зв'язуванні з A2 (Scandella, D. et al., 1992, *Thromb Haemost.* 67(6), pp. 665-71). Далі цей епітоп домену A2 був виявлений у залишку 484-508 домену A2, коли в результаті експериментів було виявлено, що mAB 413 IgG і чотири інгібітори пацієнта не інгібують гібридний людина/свиня мутеїн FVIII, у якому залишки 484-508 домену A2 були заміщені відповідними залишками домену A2 свині (Healey, J. et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270(24), pp. 14505-9). Такий гібридний FVIII також був більш стійким, принаймні, у половини з 23 пацієнтів, у яких досліджувалася плазма (Barrow, R. et al., 2000, *Blood* 95(2), pp. 564-8). При аланін-скануючому мутагенезі був ідентифікований залишок 487 як основний для зв'язування з усіма п'ятьма тестованими інгібіторами пацієнтів, незважаючи на те, що всі залишки 484, 487, 489 і 492, були важливими для взаємодії з mAB 413 IgG (Lubin, I., *J. Biol. Chem.* 272(48), pp. 30191-5). Титри інгібіторних антитіл у миші, яка отримувала мутант R484A/R489A/P492, а не мутант R484A/R489A, були значно нижчими, ніж у миші, яка одержувала контрольний людський BDD FVIII (Parker, E. et al., 2004, *Blood* 104(3), pp. 704-10). Таким чином, область 484-508 домену A2, очевидно, є сайтом зв'язування для інгібіторів з активністю FVIII.

Іншою проблемою традиційної терапії, крім імунної відповіді на FVIII, є те, що вона вимагає частого введення дози через короткий період напіввиведення FVIII *in vivo*. Були досліджені механізми виведення FVIII з кровотоку.

Виведення FVIII із кровотоку частково пояснюється специфічним зв'язуванням із протеїном, родинним рецептору ліпопротеїну низької щільності (LRP) і печінковому рецептору виведення із широкою лігандною специфічністю (Oldenburg et al., 2004, *Haemophilia* 10 Suppl 4, pp. 133-139). Недавно було також показано, що рецептор ліпопротеїну низької щільності (LDL) відіграє певну роль у виведенні FVIII, наприклад, за допомогою спільної з LRP дії з регулювання рівнів FVIII у плазмі (Bovenschen et al., 2005, *Blood* 106, pp. 906-910). Обидві взаємодії полегшуються зв'язуванням з гепаринів сульфат протеогліканами (HSPGs) поверхні клітин. Період напіввиведення із плазми в миші може бути пролонгований до 3,3 разів, коли блокований LRP, або в 5,5 разів, коли блоковані як LRP, так і HSPGs поверхні клітин (Sarafanov et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276, pp. 11970-11979). Вважа-

ється, що HSPGs акумулюють FVIII на клітинній поверхні та надають його LRP. Сайти зв'язування LRP на FVIII локалізовані на залишках 484-509 A2 (Saenko et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, pp. 37685-37692), залишках 1811-1818 A3 (Bovenschen et al., 2003, J. Biol. Chem. 278, pp. 9370-9377) і епітопі в домені C2 (Lenting et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, pp. 23734-23739).

Крім того, FVIII виводиться із кровотоку під дією протеаз. Щоб зрозуміти цей ефект, потрібно зрозуміти механізм, за допомогою якого FVIII залучений у згортання крові. FVIII, пов'язаний з фактором фон Вілебранда (vWF) циркулює, як гетеродимер, що складається з важкого та легкого ланцюгів. vWF-зв'язування відбувається на залишках 1649-1689 FVIII (Foster et al., 1988, J. Biol. Chem. 263, pp. 5230-5234) і частині доменів C1 (Jacquemin et al., 2000, Blood 96, pp. 958-965) і C2 (Spiegel, P. et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(51), pp. 53691-8). FVIII активується тромбіном, що розщеплює пептидні зв'язки після залишків 372, 740 і 1689, продукуючи гетеротриммер з доменів A1, A2 і A3-C1-C2 (Pittman et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 276, pp. 12434-12439). По закінченні активації FVIII дисоціює від vWF і накопичується на поверхні клітин тромбоцитів шляхом зв'язування з фосфоліпідом. Фосфоліпідне зв'язування включає залишки 2199, 2200, 2251 і 2252 FVIII (Gilbert et al., 2002, J. Biol. Chem. 277, pp. 6374-6381). Там він зв'язується з коагуляційним фактором IX (FIX) через взаємодію із залишками 558-565 (Fay et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, pp. 20522-20527) і залишками 1811-1818 FVIII (Lenting et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, pp. 1935-1940) та з коагуляційним фактором X (FX) через взаємодію із залишками 349-372 FVIII (Nogami et al., 2004, J. Biol. Chem. 279, pp. 15763-15771) і діє як кофактор для FIX-активації FX, істотного компонента природного шляху згортання крові. Активований FVIII (FVIIIa) частково інактивується протеазою, що активується протеїном C (APC) через розщеплення FVIII після залишків 336 і 562 (Regan et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, pp. 3982-3987). Однак, передбачуваним основним фактором інактивації, є дисоціація домену A2 від доменів A1 і A3-C1-C2 (Fay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, pp. 8957-8962).

Одним з методів, який, як було продемонстровано, збільшує *in vivo* період напіввиведення протеїну, є ПЕГ-ілування. ПЕГ-ілування являє собою ковалентне приєднання довголанцюжкових молекул поліетиленгліколю (ПЕГ) до протеїну або іншої молекули. ПЕГ може мати лінійну форму або розгалужену форму, щоб одержати різні молекули з різними властивостями. Крім збільшення періоду напіввиведення пептидів або протеїнів ПЕГ-ілування використовується для зменшення утворення антитіл, захисту протеїну від протеазного розщеплення та збереження матеріалу поза нирковим фільтратом (Harris et al., 2001, Clinical Pharmacokinetics 40, pp. 539-51). Крім того, ПЕГ-ілування може також збільшувати загальну стабільність і розчинність протеїну. Нарешті, підтримується концентрація ПЕГ-ілованих протеїнів у плазмі може зменшувати ступінь побічних ефектів шляхом зменшення провалів у пікових рівнях лікарсь-

кого засобу, знімаючи, таким чином, необхідність введення надфізіологічних рівнів протеїну на ранніх часових відрізках.

З різним ступенем успіху випробувалися випадкові модифікації FVIII, отримані шляхом спрямованого впливу первинних амінів (N-кінцевий і лізини) великими полімерами, такими як ПЕГ і декстран (WO94/15625, патент US 4970300, патент US 6048720). Найбільш яскраве поліпшення, опубліковане в патентній заявці в 1994 р. (WO94/15625), показало 4-кратне збільшення періоду напіввиведення, однак за рахунок 2-кратної втрати активності після реакції FVIII повної довжини з 50-кратним надлишком ПЕГ. В WO2004/075923 розкриваються кон'югати FVIII і поліетиленгліколю, які утворюються через випадкові модифікації. У минулому випадково ПЕГ-іловані протеїни, такі як інтерферон-альфа (Kozlowski et al., 2001, BioDrugs 15, pp. 419-429), схвалювалися як терапевтичні засоби.

Однак цей підхід, заснований на випадкових модифікаціях, є більш проблематичним відносно гетеродимерного FVIII. FVIII має сотні потенційних сайтів ПЕГ-ілування, включаючи 158 лізинів, два N-кінці та множини гістидинів, серпнів, треонинів і тирозинів, кожен з яких потенційно міг би бути ПЕГ-ілованим реагентами, спочатку націленими на первинні аміни. Наприклад, було показано, що головним позиційним ізомером для ПЕГ-ілованого інтерферону Альфа-2b є гістидин (Wang et al., 2000, Biochemistry 39, pp. 10634-10640). Крім того, результатом гетерогенної обробки повнорозмірного FVIII може бути суміш вихідного матеріалу, що надалі робить ПЕГ-іловані продукти більше складними. Додатковим недоліком неконтролювання сайту ПЕГ-ілування на FVIII є потенційне зниження активності, у тих випадках, коли ПЕГ повинен був приєднатися на або поблизу основних активних сайтів, особливо в тих випадках, коли більш ніж один ПЕГ або одиничний ПЕГ великого розміру кон'югує з FVIII. Оскільки випадкове ПЕГ-ілування постійно продукує велику кількість ПЕГ-ілованих продуктів, очищення з метою одержання саме моноПЕГ-ілованих продуктів приведе до істотного зниження виходу цих продуктів. Нарешті, величезна гетерогенність профілю продукту буде робити майже неможливим безперервний синтез і дослідження кожної серії. Оскільки товарне виробництво вимагає постійного, добре дослідженого продукту, гетерогенність продукту є бар'єром для комерціалізації. Через всі ці причини бажаним є більш визначений метод ПЕГ-ілування FVIII.

У недавньому огляді (Kochendoerfer, G., Curr. Opin. Chem. Biol. 2005, доступному он-лайн з 15 жовтня 2005 р., прямий предметний ідентифікатор doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.007) були узагальнені різні стратегії сайт-спрямованого ПЕГ-ілування протеїнів. Один з підходів включає введення неприродної амінокислоти в протеїни за допомогою хімічного синтезу або рекомбінантної експресії, за якими йде додавання похідної ПЕГ, що буде специфічно реагувати з неприродною амінокислотою. Наприклад, неприродна амінокислота може бути такою, що містить кетогрупу, що не трапляється в нативних протеїнах. Однак хімічний синтез таких

великих протеїнів, як FVIII, неможливий. Сучасна межа пептидного синтезу становить близько 50 залишків. Для одержання більших частин поліпептиду можна лігувати кілька пептидів, але щоб одержати хоча б FVIII з делетованим В-доменом, потрібно було б понад 20 лігувань, внаслідок чого вихід продукту становив би менше 1% навіть за ідеальних умов реакції. Рекombінантна експресія протеїнів з неприродними амінокислотами обмежена, головним чином, експресійними системами не-ссавців. Вважають, що цей підхід є проблематичним для великого та складного протеїну, такого як FVIII, експресія якого необхідна в системах ссавців.

Інший підхід до сайт-спрямованого ПЕГ-ілування протеїнів полягає в спрямованому впливі аміну N-кінця основного ланцюга ПЕГ-альдегідами. При цьому процесі потрібний низький рН для досягнення специфічності щодо інших аміних груп, що, однак, є несумісним з вузьким інтервалом майже нейтрального рН, необхідного для стабільності FVIII (Wang et al., 2003, International J. Pharmaceutics 259, pp. 1-15). Більше того, N-кінцеве ПЕГ-ілування FVIII може не привести до поліпшення періоду напіввиведення з плазми, якщо ця область не бере участь у виведенні з плазми. Насправді, N-кінцева область легкого ланцюга FVIII залучена у зв'язування з vWF, протеїном-носієм, що є основним для збереження FVIII при кровообігу. При N-кінцевій модифікації фактора FVIII найбільш важливий зв'язок з vWF може бути зруйнований або ослаблений. Таким чином, N-кінцеве ПЕГ-ілування FVIII може дати протилежний ефект зменшення періоду напіввиведення FVIII із плазми.

WO90/12874 розкриває сайт-специфічну модифікацію людського IL-3, колонієстимулюючого фактора гранулоцитів і еритропоєтинових поліпептидів шляхом введення цистеїну або заміною ним іншої амінокислоти з подальшим додаванням ліганду, що містить сульфгідрильну реактивну групу. Ліганд вибірково приєднується до цистеїнових залишків. Модифікація FVIII або будь-якого його варіанта не розкривається.

З сформульованих вище причин існує необхідність у поліпшеному варіанті FVIII, що має більшу тривалість дії *in vivo* і знижену імуногенність, зберігаючи, у той самий час, функціональну активність. Крім того, бажано, щоб такий протеїн продукувався як гомогенний продукт у надійний спосіб.

Стисле викладення суті винаходу

Мета цього винаходу полягає у забезпеченні кон'югованого з біосумісним полімером функціонального поліпептиду FVIII, що має поліпшені фармакокінетичні та терапевтичні властивості.

Іншою метою цього винаходу є забезпечення кон'югованого з біосумісним полімером протеїну FVIII з делетованим В-доменом, що має поліпшені фармакокінетичні властивості.

Ще однією метою винаходу є забезпечення кон'югованого з біосумісним полімером функціонального поліпептиду FVIII, що має ослаблене зв'язування із протеїном, родинним рецептору ліпопротеїну низької щільності (LRP), рецептором ліпопротеїну низької щільності (LDL), гепарин-

сульфат протеогліканами (HSPGs) і/або інгібіторними антитілами проти FVIII.

Ще однією метою цього винаходу є забезпечення поліпшеного варіанта FVIII, що має більшу тривалість дії *in vivo* і зменшену імуногенність і який можна отримувати як гомогенний продукт у надійний спосіб.

В одному аспекті винаходу забезпечується кон'югат, що має прокоагулянтну активність фактора FVIII, що включає функціональний поліпептид фактора FVIII, ковалентно з'єднаний на одному або більше своїх попередньо заданих сайтах з одним або більше біосумісними полімерами, де попередньо заданий сайт не є N-кінцевим аміном. Винахід також включає спосіб одержання цього кон'югата, що передбачає введення мутації нуклеотидної послідовності, що кодує функціональний поліпептид фактора FVIII, з метою заміщення в попередньо заданому сайті послідовністю, що кодує цистеїновий залишок; експресію мутованої нуклеотидної послідовності для одержання поліпшеного цистеїном мутеїну; очищення мутеїну; реагування мутеїну з біосумісним полімером, що активований для реагування з поліпептидами по суті тільки на введених цистеїнових залишках таким чином, щоб утворився кон'югат; і очищення кон'югата. Винахід також спрямований на фармацевтичні композиції, що включають кон'югат і фармацевтично прийнятний ад'ювант, і на способи лікування гемофілії шляхом введення терапевтично ефективних кількостей цих фармацевтичних композицій ссавцю, який їх потребує.

Винахід також стосується способу сайт-спрямованого ПЕГ-ілування мутеїну фактора FVIII, що включає (а) експресію сайт-спрямованого мутеїну фактора FVIII, де мутеїн має цистеїнове заміщення в амінокислотному залишку на зовнішній поверхні мутеїну фактора FVIII і цей цистеїн є кепованим; (b) контактування цистеїнового мутеїну з відновлювачем в умовах, у яких цистеїновий мутеїн м'яко відновлюється та відокремлюється кеп; (c) вилучення кепи та відновлювача з цистеїнового мутеїну; і (d) обробку, принаймні, через близько 5 хвилин після видалення відновлювача, цистеїнового мутеїну за допомогою ПЕГ, що включає сульфгідрильний зв'язувальний засіб в умовах, у яких утворюється ПЕГ-ілований мутеїн фактора FVIII.

Короткий опис фігур креслень

Фіг. 1. Карти векторів і стратегія мутагенезу для ПЕГ-мутеїнів.

Фіг. 2. Профіль поглинання УФ при 280 нм відносно часу для ПЕГ-2-протеїну, очищеного через хроматографічну колонку з моноклональними антитілами до FVIII. Хроматографію виконували з використанням хроматографічної системи AKTA® Explorer 100 від Amersham Bioscience.

Фіг. 3. Тристадійний спосіб сайт-спрямованого ПЕГ-ілування. ПЕГ являє собою цистеїн-реактивний ПЕГ, такий як ПЕГ-малеїмід. Замкнуті смужки показують дисульфідні утворення, а незамкнуті - відновлені цистеїни.

Фіг. 4. Сайт-спрямоване ПЕГ-ілування ПЕГ2.

Фіг. 5. Сайт-спрямоване ПЕГ-ілування ПЕГ6.

Фіг. 6a. Сайт-спрямоване ПЕГ-ілування BDD, ПЕГ2, 4, 5 і 6. Верхні панелі були забарвлені антитілом до важкого (H) ланцюга, а нижні панелі - антитілом до легкого (L) ланцюга. "U" - необроблений матеріал, що містить як H, так і L.

Фіг. 6b. ПЕГ-ілування ПЕГ 15 і ПЕГ7 з ПЕГ2 і ПЕГ6 в якості контролю. Спочатку очищені ПЕГ-мутеїни (S) відновлювали за допомогою трис(2-карбоксіетил)фосфін (ТСЕР), а після вилучення відновлювача ("R") ПЕГ-ілували за допомогою ПЕГ 12 кДа ("12") або 22 кДа ("22"). Зразки наносили на 6%-ий Трис-гліцин SDS PAGE і забарвлювали антитілом до важкого ланцюга (HC) на лівій панелі або антитілом до легкого ланцюга (LC) на правій панелі. "U" - необроблений матеріал, що містить як HC, так і LC. ПЕГ-іловані смужки забарвлені точками.

Фіг. 6c. ПЕГ-ілування ПЕГ2+6 з ПЕГ2 і ПЕГ6 в якості контролю. ПЕГ2, ПЕГ6 або ПЕГ2+6 відновлювали за допомогою ТСЕР, а після вилучення відновлювача ("R") ПЕГ-ілували за допомогою ПЕГ 5 кДа ("5") або 43 кДа ("43"). ПЕГ2+6 також ПЕГ-ілували з використанням ПЕГ 12, 22 і 33 кДа. Зразки наносили на 6%-ий Трис-гліцин SDS PAGE і забарвлювали кумасі для протеїнів ліворуч або антитілом до важкого ланцюга (H) або легкого ланцюга (L). "U" - необроблений матеріал, що містить як H, так і L. ПЕГ-іловані смужки забарвлені точками.

Фіг. 6d ПЕГ-ілування FVIII дикого типу повної довжини (KG-2) з ПЕГ2 в якості контролю. Лівий гель забарвлювали кумасі для протеїнів, а правий гель - йодом для ПЕГ. "BDD U" - необроблений BDD-матеріал, що містить як H, так і L. ПЕГ-іловані смужки забарвлені точками.

Фіг. 7. Розщеплення тромбіном ПЕГ-ілованого ПЕГ2. N-кінцева половина домену A2 забарвлена в блакитний колір, а C-кінцева половина - у зелений, епітоп антитіла R8B12 забарвлений темно-зеленим (правий зразок FVIII). ПЕГ2 (доріжка 1) і 22 кДа-ПЕГ-ілований ПЕГ2 (доріжка 2) обробляли тромбіном (доріжки 3 і 4, відповідно), а потім наносили на 7%-ий Трис-ацетатний гель (Invitrogen) і забарвлювали антитілом R8B12. Кожна доріжка містить 50 нг FVIII.

Фіг. 8. Розщеплення тромбіном ПЕГ-ілованого FVIII дикого типу повної довжини (KG-2). "S" = вихідний матеріал KG-2. "R" = відновлений KG-2, відновлювач вилучений. "P" = "R", ПЕГ-ілований ПЕГ 43 кДа. "Чистий" = "P", очищений від надлишку ПЕГ. "L" = легкий ланцюг. ПЕГ-іловані смужки забарвлені точками.

Фіг. 9. Забарвлення йодом ПЕГ-ілованого ПЕГ2. 22- або 43 кДа-ПЕГ-ілований ПЕГ2 наносили на 6%-ий Трис-гліциновий гель і забарвлювали антитілом R8B12 до FVIII (доріжки 1 і 2) або йодом (доріжки 3 і 4). Дві плями були вирівняні відповідно до їх маркерних доріжок молекулярної ваги. Доріжки 1 і 2 містять близько 30 нг FVIII, у той час як доріжки 3 і 4 містять близько 2 мкг.

Фіг. 10. MALDI-мас-спектрометричний аналіз ПЕГ-ілованого та неПЕГ-ілованого ПЕГ2. MALDI-мас-спектрометрія виконувалася на ПЕГ2 (Фіг. 10a) або на 22 кДа-ПЕГ-ілованому ПЕГ2 (Фіг. 10b). Після ПЕГ-ілування пік важкого (H) ланцюга ПЕГ2

значно зменшується та з'являється новий пік (H+ПЕГ) із центром на 111 кДа (ПЕГ 22 кДа + важкий ланцюг 89 кДа). Очікуваний пік ПЕГ-ілованого легкого (L) ланцюга із центром на 100 кДа (ПЕГ 22 кДа + легкий ланцюг 83 кДа) не виявляється.

Фіг. 11. MALDI-мас-спектрометрія ПЕГ-ілованого та неПЕГ-ілованого ПЕГ2 після розщеплення тромбіном.

Фіг. 12. MALDI-мас-спектрометричний аналіз ПЕГ-ілованого ПЕГ6 до та після розщеплення тромбіном.

Фіг. 13. Профіль поглинання УФ на 280 нм ПЕГ-ілованого ПЕГ2, очищеного на колонці, що використовується при гелі хроматографії.

Фіг. 14. Профіль поглинання УФ на 280 нм ПЕГ-ілованого та неПЕГ-ілованого ПЕГ6, очищеного на катіон-обмінній колонці.

Фіг. 15. Профіль поглинання УФ на 280 нм ПЕГ-ілованого та неПЕГ-ілованого ПЕГ6, на колонці, що використовується в гелі хроматографії.

Фіг. 16. Порівняння активності ПЕГ-ілованого протеїну з активністю неПЕГ-ілованого протеїну, вимірювана хромогенним аналізом і коагуляційним аналізом. Очищений FVIII повної довжини поданий як KG-2. Отриманий відсоток активності визначався діленням величини зразка, обробленого ПЕГ після відновлення та видалення відновлювача, на величину зразка, обробленого буферним контролем, беручи до уваги результат ПЕГ-ілування.

Фіг. 17. Фармакокінетичне (РК) дослідження кролика відносно ПЕГ-ілованого ПЕГ2 порівняно з ПЕГ2.

Фіг. 18. РК-дослідження кролика відносно ПЕГ-ілованого ПЕГ2 порівняно з BDD і ПЕГ2. Р-значення є порівняннями між ПЕГ-ілованим ПЕГ2 і BDD.

Фіг. 19. РК-дослідження кролика відносно ПЕГ-ілованого ПЕГ6 порівняно з BDD і ПЕГ6.

Фіг. 20. РК-дослідження кролика відносно ПЕГ-ілованого FVIII дикого типу повної довжини ("fl") порівняно з немодифікованим FVIII fl.

Фіг. 21. РК-дослідження гемофільної миші відносно ПЕГ-ілованого ПЕГ6 порівняно з BDD і ПЕГ6.

Фіг. 22. РК-дослідження нормальної миші відносно 22- і 43 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ2 порівняно з BDD.

Фіг. 23. РК-дослідження 22 нормальної миші відносно ПЕГ-ілованого ПЕГ2 розміром 22 кДа у порівнянні з BDD протягом усього часу.

Фіг. 24. Гістограма збору Гемофільного Мишачого (BDD) Фактора VIII, що показує фармакокінетичну оцінку періоду напіввиведення BDD-фактора VIII у двох видів в аналізі гемофільної миші.

Фіг. 25. Дослідження розриву нирки гемофільної миші відносно ПЕГ-ілованого ПЕГ2 розміром 22 кДа порівняно з BDD. У результаті обробки носієм миші мали втрату крові 25 мкл/грам ваги тіла.

Фіг. 26. Хромогенна активність ПЕГ-ілованого ПЕГ2 і BDD у присутності кількостей, що збільшуються, антитіл до FVIII. Епітоп антитіла зазначений у дужках.

Фіг. 27. Хромогенна активність ПЕГ-ілованого ПЕГ2 у присутності кількостей, що збільшуються, антитіл mAB 413 до FVIII.

Фіг. 28. Хромогенна активність BDD, 43 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ2, 33 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ6 і 33 кДа-диПЕГ-ілованого ПЕГ2+6 у присутності плазми людини, що походить від пацієнтів, у яких виробилися інгібітори до FVIII. Інгібіторний титр і дані про зібрану кров зазначені зверху. Дві верхні панелі включають дані плазми, зібраної у пацієнтів, розведеної в 5-405 разів. Нижня ліва панель показує розведення 1:15 для пацієнтів із плазмою HRF-828. Нижня права панель підтверджує, що 0,064 МО/мл, використані для кожного зразка FVIII на двох верхніх панелях, не є дозою насичення.

Фіг. 29. Метод скринінга та підтвердження ПЕГ-ілування. Верхня панель показує схематичний скринінг ПЕГ-ілування транз'єнтно експресованих ПЕГ-мутеїнів. Нижня панель показує Вестерн-аналіз ПЕГ-ілованих продуктів з використанням специфічного антитіла до важкого ("H") ланцюга (ліворуч) або специфічного антитіла до легкого ("L") ланцюга (праворуч). ПЕГ-іловані смуги забарвлені точками. "U" - необроблений матеріал, що містить як H, так і L.

Фіг. 30. Скринінг ПЕГ-ілування ПЕГ15-17. Вестерн-аналіз ПЕГ-ілованих продуктів з використанням специфічних антитіл до важкого ("H") ланцюга (R8B12 і 58.12) або специфічних антитіл до легкого ("L") ланцюга антитіл (C7F7 і GM). Всі три мутеїни відібрані по важкому ланцюгу, з відносною ефективністю ПЕГ-ілування ПЕГ15>ПЕГ16>ПЕГ17. ПЕГ-іловані смуги забарвлені точками. "U" - необроблений матеріал, що містить як H, так і L.

Фіг. 31. Гель, що показує ПЕГ-ілування ПЕГ2+14 як функцію концентрації відновлювача. ПЕГ2+14 обробляли 67-670 мкМ ТСЕР протягом 30 хв при 4°C. Відновлювач видаляли обертовою колонкою, після чого відбувалось ПЕГ-ілування за допомогою ПЕГ 12 кДа. Важкий і легкий ланцюги FVIII забарвлені "H" і "L", відповідно. Дві точки вказують на важкий та легкий ПЕГ-іловані ланцюги.

Фіг. 32. Розгорнуті мас-спектри ПЕГ2+14, обробленого 67 - 670 мкМ ТСЕР з вилученням потім відновлювачем.

Докладний опис винаходу

Цей винахід ґрунтується на відкритті того, що поліпептиди, які мають активність FVIII, можуть бути ковалентно з'єднані на попередньо заданому сайті, що не є N-кінцевим аміном, з біосумісним полімером і що такі поліпептиди значною мірою зберігають свою коагуляційну активність. Крім того, ці поліпептидні кон'югати мають поліпшений час циркуляції в крові та знижену антигенність. Кон'югати відповідно до винаходу мають перевагу над кон'югатами, відомими з рівня техніки, які мають випадкові приєднання полімеру до FVIII або мають приєднання до N-кінця. Сайт-спрямоване приєднання дозволяє конструювати модифікації, які не зачіпають області, необхідні для біологічної активності та, таким чином, істотно зберігають активність FVIII. Воно також дозволяє здійснити приєднання полімерів до блоку зв'язування на сайтах, залучених до виведення FVIII. Сайт-спрямоване приєднання також дозволяє одержати більш однорідний продукт, ніж гетерогенні кон'югати, які одержують в рівні техніки шляхом випадкового приєднання полімерів. За рахунок того, що

приєднання до N-кінцевого аміну не здійснюється, кон'югати згідно з цим винаходом не втрачають активності при приєднанні ліганду на активному сайті поліпептиду FVIII. Вважають, що N-кінцева область легкого ланцюга бере участь у зв'язуванні фактора vWF з FVIII, що є стабілізуючим зв'язуванням у кровотоці.

Визначення

Біосумісний полімер. Біосумісний полімер включає поліалкілен оксиди, зокрема, як поліетиленгліколь (ПЕГ), декстрини, коломінікові хітосани або інші полімери засновані на вуглеводнях, полімери амінокислот, похідні біотину, полі вініловий спирт (PVA), полікарбоксилати, полівінілпіролідон, співполімер етилену з ангідридом малеїнової кислоти, співполімер стиролу з ангідридом малеїнової кислоти, поліоксазолін, поліакрилоїморфолін, гепарин, альбумін, целюлози, гідролізати хітосани, крохмалі, такі як гідроксietил-крохмалі та гідрокси-пропіл-крохмалі, глікоген, агарози і їх похідні, гуарова камедь, пулулан, інулін, ксантанова камедь, карагенан, пектин, гідролізати альгінової кислоти, інші біополімери та будь-які їх еквіваленти. Більш прийнятним є поліетиленгліколь і ще більш прийнятним є метоксиполіетиленгліколь (mPEG). Іншими корисними поліалкіленгліколевіми сполуками є поліпропіленгліколі (PPG), полібутиленгліколі (PBG), ПЕГ-гліцидил ефіри (ЕрохРЕГ), ПЕГ-оксикарбонілімідазол (CDI-РЕГ), розгалужені поліетиленгліколі, лінійні поліетиленгліколі, вилчасті поліетиленгліколі та багатопроменеві або "надрозгалужені" поліетиленгліколі (star-РЕГ).

Поліетиленгліколь (ПЕГ). "ПЕГ" і "поліетиленгліколь" використовуються тут взаємозамінно та включають будь-який водорозчинний полі(етиленоксид). У типовому випадку, ПЕГ для використання відповідно до винаходу включають такі структури:  $--(OCH_2CH_2)_n--$ , де (n) - від 2 до 4000. Використовуваний тут ПЕГ також включає  $--CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n--CH_2CH_2--$  і  $--(OCH_2CH_2)_nO--$ , залежно від того, заміщені або не заміщені термінальні кисні. У всьому описі та пунктах формули винаходу варто пам'ятати, що термін "ПЕГ" включає структури, що мають різні термінальні та "кінцеві кепувальні" групи, такі, без обмеження, як гідроксильна або C<sub>1-20</sub>-алкокси група. Термін "ПЕГ" також означає полімер, що містить більшість, тобто понад 50%, субодиниць, що повторюються  $--OCH_2CH_2--$ . Що стосується специфічних форм, ПЕГ може мати будь-яку кількість різновидів молекулярних ваг, а також структур або геометрій, таких як розгалужена, лінійна, вилчаста та багатофункціональна.

ПЕГ-ілування. ПЕГ-ілування - це процес, за допомогою якого поліетиленгліколь (ПЕГ) ковалентно приєднується до молекули, такої як протеїн.

Активована або активна функціональна група. Коли функціональна група, така як біосумісний полімер, позначається як активована, функціональна група легко реагує з електрофілом або нуклеофілом на іншій молекулі. FVIII з делетованим В-доменом (BDD). Термін BDD, що вживається тут, характеризується наявністю амінокислотної послідовності, у якій є делеція всіх, крім 14-ти, амінокислот В-домену FVIII. Перші 4 амінокислоти В-

домену ((SFSQ, SEQ ID NO:1) зв'язані з 10 останніми залишками В-домену (NPPVLKRHQR, SEQ ID NO:2). (Lind, P. et al., 1995, Eur. J. Biochem. 232, pp. 19-27). Використовуваний тут BDD має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3.

FVIII. Фактор VIII (FVIII) згортання крові являє собою глікопротеїн, що синтезується та виділяється у кровотік печінкою. При циркуляції крові він зв'язується з фактором фон Вілебранда (vWF, також відомим як родинний Фактор VIII антиген) з утворенням стійкого комплексу. Після активації тромбіном він дисоціює від комплексу та взаємодіє з іншими факторами згортання крові в коагуляційному каскаді, що у підсумку веде до утворення тромбів. Людський FVIII повної довжини має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, хоча можливі алейні варіанти.

Функціональний поліпептид фактора VIII. Термін "функціональний поліпептид фактора VIII", що вживається тут, означає функціональний поліпептид або комбінацію поліпептидів, яка здатна, *in vivo* або *in vitro*, коректувати недостатність фактора VIII у людини, що характеризується, наприклад, гемофілією А. У натуральному стані фактор VIII має численні деградаційні та процесовані форми. Як показано тут, вони походять протеолітично з попередника, одноланцюжкового протеїну. Такий одноланцюжковий протеїн, а також різні деградаційні продукти, які мають біологічну активність корекції недостатності фактора VIII у людини, будуть функціональним поліпептидом фактора VIII. Імовірно, існують алейні варіанти. Функціональними поліпептидами фактора VIII будуть всі такі алейні варіації, глікозиловані варіанти, модифікації та фрагменти, що приводять до похідних фактора VIII тією мірою, наскільки вони містять функціональний сегмент людського фактора VIII, і особлива, характерна для людського фактора VIII функціональна активність залишається по суті не порушеною. Ці похідні фактора VIII, що мають необхідну функціональну активність, можуть бути легко ідентифіковані описаними тут простими *in vitro*-тестами. Крім того, функціональний поліпептид фактора VIII здатний каталізувати конверсію фактора X на Xa в присутності фактора IXa, кальцію та фосфоліпиду, а також коректувати коагуляційний дефект у плазмі, що походить від уражених гемофілією А індивідів. Розкрита тут послідовність людського фактора VIII, амінокислотні послідовності і їх функціональні області роблять очевидними для фахівців у цій галузі техніки фрагменти, які можуть бути виділені за допомогою розрізування рестрикційними ферментами ДНК або протеолітичної або іншої деградації протеїну людського фактора VIII.

Термін "FIX", що вживається тут, означає Коагуляційний Фактор IX, що також відомий як Людський Фактор IX Згортання Крові або Тромбопластиний Компонент Плазми.

Термін "FX", що вживається тут, означає Коагуляційний Фактор X, що також відомий за назвою Людський Фактор X Згортання Крові та під епонімом фактор Стюарта-Прауера.

Фармакокінетика. "Фармакокінетика" ("PK") - цей термін використовується для опису властивостей поглинання, розподілу, метаболізму та елімі-

нування лікарського засобу в тілі. Поліпшення фармакокінетики лікарського засобу означає поліпшення тих його характеристик, які роблять лікарський засіб більш ефективним *in vivo* як терапевтичний агент, особливо тривалості його корисної дії в тілі.

Мутеїн. Мутеїн являє собою отриманий за допомогою генетичної інженерії протеїн, що виникає як результат мутації протеїну або поліпептиду, що індукується у лабораторії.

Терміни "протеїн" і "поліпептид", що вживаються тут, є синонімами.

Термін "рецептор виведення FVIII", що вживається тут, означає рецепторну область на функціональному поліпептиді FVIII, що зв'язується або з'єднується з однією або більше іншими молекулами, що приводить до виведення FVIII з кровотоку. Рецептори виведення фактора VIII включають, зокрема, області молекули FVIII, які зв'язуються з LRP, LDL-рецептором і/або HSPG.

Обговорення

Вважається, що будь-який функціональний поліпептид фактора FVIII може бути мутований у попередньо заданому сайті, а потім ковалентно з'єднаний у цьому сайті з біосумісним полімером згідно зі способами відповідно до винаходу. Придатними поліпептидами є, зокрема, повнорозмірний фактор FVIII з амінокислотною послідовністю, показаною в SEQ ID NO:4, і BDD FVIII, що має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO:3. BDD FVIII є більш прийнятним.

Біосумісний полімер, використовуваний у кон'югатах відповідно до винаходу, може являти собою будь-який з полімерів, зазначених вище. Біосумісний полімер вибирається для того, щоб досягти бажаного поліпшення у фармакокінетиці. Наприклад, ідентичність, розмір і структура полімеру вибирається так, щоб збільшити період напіввиведення поліпептиду, що має активність FVIII, із кровотоку або щоб зменшити антигенність поліпептиду без небажаного зниження його активності. Більш прийнятно, полімер включає ПЕГ, і ще більш прийнятно має, принаймні, 50% молекулярної ваги ПЕГ. В одному варіанті виконання полімер являє собою поліетиленгліколь, термінально кепований кінцевим кепуючим фрагментом, таким як гідроксил, алкокси, заміщене алкокси, алкенокси, заміщене алкенокси, алкінокси, заміщене алкінокси, арилокси та заміщене арилокси. Ще більш прийнятними є полімери, що включають метокси-поліетиленгліколь. І ще більш прийнятними є полімери, що включають метокси-поліетиленгліколь, що має розмір в інтервалі від 3 кДа до 100 кДа, і більш прийнятно - від 5 кДа до 64 кДа або від 5 кДа до 43 кДа.

Більш прийнятно, полімер містить реакційний фрагмент. Наприклад, в одному варіанті виконання винаходу полімер містить сульфгідрильний реакційний фрагмент, що може реагувати із цистеїном функціонального поліпептиду фактора FVIII з утворенням ковалентного зв'язку. Такі сульфгідрильні реакційні фрагменти охоплюють тіол, трифлат, трезилат, азиридин, оксиран, S-піридил або малеїмідні фрагменти. Більш прийнятним є малеїмідний фрагмент. В одному виконанні полімер є



лінійним і має на одному кінці "кеп", що не є дуже сильно реактивним щодо сульфгідрилів (такий як метоксисполука), і на іншому кінці - сульфгідрильний реакційний фрагмент. У більш прийнятному виконанні кон'югат включає ПЕГ-малеїмід і має розмір в інтервалі від 5 кДа до 64 кДа.

У наведених далі прикладах подані рекомендації з вибору придатних біосумісних полімерів.

Сайт-спрямована мутація нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який має активність FVIII, може бути здійснена будь-яким методом, відомим у цій галузі техніки. Більш прийнятні методи включають мутагенез із метою введення цистеїнового кодона в сайт, вибраний для ковалентного приєднання полімеру. Це можна виконати, використовуючи комерційно доступний набір для сайт-спрямованого мутагенезу, такий як набір для сайт-спрямованого мутагенезу Stratagene cQuickChange™ II, набір для сайт-спрямованого мутагенезу № K1600-1 Clontech Transformer, система для сайт-спрямованого мутагенезу № 12397014 Invitrogen GenTaylor, набір системи для сайт-спрямованого мутагенезу *in vitro* № Q6210 Promega Altered Sites II або набір для ПЛР-мутагенезу № TAK RR016 Takara Minis Bio LA.

Кон'югати відповідно до винаходу можуть бути отримані шляхом первісного заміщення кодона однієї або більше амінокислот на поверхні функціонального поліпептиду FVIII кодоном цистеїну з подальшим одержанням цистеїнового мутеїну в рекомбінантній експресійній системі, проведенням реакції мутеїну із цистеїн-специфічним полімерним реагентом і очищенням мутеїну.

У цьому способі додавання полімеру до сайту цистеїну може виконуватись за рахунок малеїмиду, функціонально активного на полімері. Приклади цієї технології наведені нижче. Кількість використовуваного сульфгідрильного реакційного полімеру має бути, принаймні, еквімолярною молярній кількості цистеїнів, які повинні бути продукovanі, а більш прийнятно перебувати в надлишку. Більш прийнятно, сульфгідрильний реакційний полімер використовується, принаймні, в 5-кратному молярному надлишку, і ще більш прийнятно використовується, принаймні, у десятикратному надлишку. Інші умови, сприятливі для ковалентного приєднання, входять в обсяг знань фахівця цій галузі техніки.

У прикладах, які наведені нижче, мутеїни мають традиційні в цій галузі техніки назви. Повнорозмірна амінокислотна послідовність зрілого Фактора VIII, що наведена в SEQ ID NO:4, є основою для надання назв мутантам. Будучи секретованим протеїном, FVIII містить сигнальну послідовність, що протеолітично відщепляється під час трансляційного процесу. Після видалення сигнальної послідовності з 19 амінокислот першою амінокислотою секретованого FVIII-продукту є аланін.

Коли йдеться про мутовані амінокислоти в BDD-FVIII, мутовані амінокислоти позначаються в цьому документі у традиційний спосіб їх положення у послідовності FVIII повної довжини. Наприклад, розглянутий нижче мутеїн ПЕГ6 позначається K1808C, оскільки в ньому лізин (K) у положенні,

аналогічному положенню 1808 у послідовності повної довжини, замінений на цистеїн (C).

Попередньо заданий сайт для ковалентного зв'язування полімеру краще за все вибирати із сайтів, розташованих на поверхні поліпептиду, які не впливають на активність FVIII або інші механізми, які стабілізують FVIII *in vivo*, такі як зв'язування з vWF. Крім того, краще вибирати такі сайти, участь яких відома в механізмах, за допомогою яких FVIII деактивується або виводиться із кровотоку. Докладно вибір таких сайтів розглядається нижче. Більш прийнятні сайти охоплюють амінокислотний залишок на або поблизу сайту зв'язування (а) протеїну, родинного рецептора ліпопротеїну низької щільності, (b) гепаринсульфат протеоглікану, (c) рецептора ліпопротеїну низької щільності та/або (d) антитіл, що інгібуються фактор FVIII. Вираз "на або поблизу сайту зв'язування" означає залишок, що перебуває досить близько до сайту зв'язування, так що ковалентне приєднання біосумісного полімеру до цього сайту привело б до стеричного пошкодження сайту зв'язування. Передбачається, що такий сайт, приміром, перебуває в межах 20 Å від сайту зв'язування.

В одному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду фактора VIII на амінокислотному залишку в або поблизу (а) рецептора виведення фактора VIII, як визначено вище, (b) сайту зв'язування протеази, здатної деградувати фактор VIII, і/або (c) сайту зв'язування інгібіторних антитіл до фактора VIII. Протеази можуть бути активовані протеїном С (APC). В іншому варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду фактора VIII у попередньо заданому сайті, так що зв'язування протеїну родинного рецептора ліпопротеїну низької щільності з поліпептидом є більше слабким, ніж з тим самим поліпептидом, коли він некон'югований, і більш прийнятно слабкішим більш ніж у два рази. В одному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду фактора VIII у попередньо заданому сайті, так що зв'язування гепаринсульфат протеогліканів з поліпептидом є більш слабким, ніж з тим самим поліпептидом, коли він некон'югований, і більш прийнятно слабкішим більше ніж у два рази. У наступному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду фактора VIII у попередньо заданому сайті, так що зв'язування інгібіторних антитіл до фактора VIII з поліпептидом є більш слабким, ніж з тим самим поліпептидом, коли він некон'югований, більш прийнятно слабкішим більше ніж у два рази, ніж зв'язування із цим поліпептидом, коли він некон'югований. В іншому виконанні біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціонального поліпептиду фактора VIII у попередньо заданому сайті, так що зв'язування рецептора ліпопротеїну низької щільності з поліпептидом є більш слабким, ніж з тим самим поліпептидом, коли він некон'югований, більш прийнятно слабкішим більше ніж у два рази. В іншому варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до функціональ-

ного поліпептиду фактора VIII у попередньо заданому сайті, так що протеаза плазми деградує поліпептид слабкіше, ніж коли цей поліпептид некон'югований. У наступному варіанті виконання винаходу деградація поліпептиду протеазою плазми є більш ніж у два рази слабкішою, ніж деградація цього поліпептиду, коли він некон'югований, за таких самих умов і за такий самий період часу.

Спорідненість зв'язування LRP, LDL і HSPG з FVIII можна визначити, використовуючи методику поверхневого плазмонного резонансу (Biacore). Наприклад, FVIII може бути нанесений прямо або опосередковано через FVIII-антитіло на Biacore™-чип, і, пропускаючи через чип різні концентрації LRP, можна виміряти як швидкість асоціації, так і швидкість дисоціації (Bovenschen N. et al., 2003, J. Biol. Chem. 278(11), pp. 9370-7). Співвідношення двох швидкостей дає величину спорідненості. При ПЕГ-ілуванні було б бажаним дворазове, більш прийнятно п'ятикратне, ще більш прийнятно десятикратне та ще більш прийнятно 30-кратне зниження спорідненості.

Деградація FVIII протеазою APC може вимірюватись будь-якими методами, відомими фахівцям у цій галузі техніки.

В одному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному або більше положеннях амінокислот 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 і 2284 фактора VIII. В іншому варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному або більше положеннях амінокислот 377, 378, 468, 491, 504, 556, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911 і 2284 фактора VIII, і (1) зв'язування кон'югата із протеїном, родинним рецептору ліпопротеїну низької щільності, є меншим, ніж зв'язування некон'югованого поліпептиду із протеїном, родинним рецептору ліпопротеїну низької щільності; (2) зв'язування кон'югата з рецептором ліпопротеїну низької щільності є меншим, ніж зв'язування некон'югованого поліпептиду з рецептором ліпопротеїну низької щільності; або (3) зв'язування кон'югата як із протеїном, родинним рецептору ліпопротеїну низької щільності, так і з рецептором ліпопротеїну низької щільності є меншим, ніж зв'язування некон'югованого поліпептиду із протеїном, родинним рецептору ліпопротеїну низької щільності, і з рецептором ліпопротеїну низької щільності.

В іншому варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному або більше положеннях амінокислот 377, 378, 468, 491, 504, 556 і 711 фактора VIII, і зв'язування кон'югата з гепаринсульфат протеогліканом менше, ніж зв'язування некон'югованого поліпептиду з гепаринсульфат протеогліканом. У наступному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному або більше положеннях амінокислот 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 і 2284 фактора VIII, і кон'югат має менше зв'язування з інгібіторними антиті-

лами до фактора VIII, ніж некон'югований поліпептид. У наступному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до поліпептиду в одному або більше положеннях амінокислот 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 і 2284, і більш прийнятно в одному або більше положеннях з 377, 378, 468, 491 504, 556, і 711 фактора VIII, і кон'югат піддається меншій деградації протеазою плазми, здатною деградувати фактор VIII, ніж некон'югований поліпептид. Ще більш прийнятним є, щоб протеаза плазми була активованим протеїном C.

У наступному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер ковалентно приєднаний до фактора VIII з делетованим В-доменом у положеннях амінокислот 129, 491, 1804 і/або 1808, більш прийнятно в положеннях 491 або 1808. У наступному варіанті виконання винаходу біосумісний полімер приєднаний до поліпептиду фактора VIII у положенні амінокислоти 1804 і включає поліетиленгліколь. Більш прийнятно, один або більше попередньо заданих сайтів для приєднання біосумісного полімеру контролюються сайт-специфічною мутацією цистеїну.

Попередньо заданими сайтами для приєднання біополімеру можуть бути один або більше сайтів, більш прийнятно один або два сайти, на функціональному поліпептиді фактора VIII. У конкретних виконаннях поліпептид є моноПЕГ-ілованим або диПЕГ-ілованим.

Винахід також стосується способу одержання кон'югата, що передбачає введення мутації в нуклеотидну послідовність, що кодує функціональний поліпептид фактора VIII, для заміщення послідовності на цистеїновий кодон у попередньо заданому сайті; експресію мутованої нуклеотидної послідовності, щоб отримати поліпшений цистеїном мутеїн; очищення мутеїну; реагування мутеїну з біосумісним полімером, що активований для реакції з поліпептидами по суті тільки з відновленими цистеїновими залишками, так що утворюється кон'югат; і очищення кон'югата. Іншим варіантом виконання винаходу є спосіб сайт-спрямованого ПЕГ-ілування мутеїну фактора VIII, що включає: (а) експресію сайт-спрямованого мутеїну фактора VIII, де мутеїн має цистеїнове заміщення амінокислотного залишку на зовнішній поверхні мутеїну фактора VIII і цей цистеїн кепують; (b) контактування цистеїнового мутеїну з відновлювачем в умовах, у яких цистеїновий мутеїн м'яко відновлюється та відокремлюється кеп; (c) видалення кепу та відновлювана з цистеїнового мутеїну; і (d) через, принаймні, близько 5 хвилин, більш прийнятно, принаймні, 15 хвилин, ще більш прийнятно, принаймні, 30 хвилин, після видалення відновлювача, обробляють цистеїновий мутеїн ПЕГом, що включає сульфгідрильний зв'язувальний фрагмент, за таких умов, щоб утворився ПЕГ-ілований мутеїн фактора VIII. Сульфгідрильний зв'язувальний фрагмент ПЕГ, вибирають із групи, що складається з тіолу, трифлату, трезилату, азиридину, оксирану, S-піридилу та малеїмідних засобів, більш прийнятно малеїмиду.

Винахід також стосується фармацевтичних композицій для парентерального введення, що включають терапевтично ефективні кількості кон'югатів цього винаходу та фармацевтично прийнятний ад'ювант. Фармацевтично прийнятні ад'юванти є речовинами, які можуть додаватися до активного інгредієнта, щоб допомогти сформулювати або стабілізувати препарат і не викликати будь-яких значних небажаних токсикологічних ефектів у пацієнта. Приклади таких ад'ювантів добре відомі фахівцям у цій галузі техніки та включають воду, цукри, такі як мальтоза або сахароза, альбумін, солі тощо. Інші ад'юванти описані, наприклад, E.W. Martin в Remington's Pharmaceutical Sciences. Такі композиції будуть містити ефективну кількість описаного тут кон'югата разом з підхожою кількістю носія, для того, щоб приготувати фармацевтично прийнятні композиції, придатні для ефективного введення хазяїну. Наприклад, кон'югат може бути парентерально введений особам, що страждають на гемофілію А, у дозі, що може змінюватися залежно від важкості випадку кровотечі. Середні дози, що вводять внутрішньо, перебувають у межах 40 одиниць на кілограм за передопераційними показниками, 15-20 одиниць на кілограм при невеликій кровотечі та 20-40 одиниць на кілограм, які вводять протягом 8-годинного періоду як підтримуючу дозу.

В одному варіанті виконання винаходу спосіб включає заміщення однієї або більше розташованих на поверхні BDD амінокислот цистеїном, одержання цистеїнового мутеїну в експресійній системі ссавців, відновлення цистеїну, що був кепований під час експресії цистеїном, із середовища вирощування, видалення відновлювана, щоб дати можливість BDD-дисульфідам відновити структуру, і реагування з реагентом цистеїн-специфічного біосумісного полімеру, такого як ПЕГ-малеїмід. Прикладами таких реагентів є ПЕГ-малеїмід з розмірами ПЕГ 5, 22 або 43 кДа, доступний від Nektar Therapeutics (Сан Карлос, Каліф.) під номерами каталогу Nektar 2D2M0H01 mPEG-MAL MW 5000 Так, 2D2M0P01 mPEG-MAL MW 20 кДа, 2D3X0P01 mPEG2-MAL MW 40 кДа, відповідно, або 12 чи 33 кДа, доступні від NOF Corporation (Токіо, Японія) під номерами каталогу NOF Sunbright ME-120MA і Sunbright ME-300MA, відповідно. ПЕГ-ілований продукт очищають, використовуючи іонообмінну хроматографію для видалення ПЕГ, що не прореагував, і гель-хроматографію для видалення BDD, що не прореагував. Цей метод може використовуватись для ідентифікації та вибіркового захисту від будь-яких небажаних взаємодій з FVIII, таких як опосередковане рецептором виведення із кровотоку, зв'язування інгібіторними антитілами та деградація протеолітичними ферментами. Нами помічено, що ПЕГ-реагент, що поставляє Nektar або NOF як такий, що має розмір, 5 кДа, протестований у нашій лабораторії виявився таким, що має розмір 6 кДа, і, аналогічно, ПЕГ-реагент, який поставляється як лінійний 20 кДа, за тестуванням виявився таким, що має розмір 22 кДа; який поставляється як 40 кДа за тестуванням мав 43 кДа; і який поставляється як 60 кДа, відповідно до тестів у нашій лабораторії мав 64 кДа.

Щоб уникнути плутанини, ми тут в обговоренні використовуємо молекулярну вагу, визначену у нашій лабораторії, за винятком ПЕГ 5 кДа, про який ми говоримо як про такий, що має розмір 5 кДа, як він ідентифікований виробником.

На додаток до цистеїнових мутацій у положеннях 491 і 1808 в BDD (розкрито вище) були здійснені цистеїнові мутації в положеннях 487, 496, 504, 468, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803 і 1804, щоб потенційно блокувати LRP-зв'язування після ПЕГ-ілування. Крім того, щоб після ПЕГ-ілування блокувати LRP- і HSPG-зв'язування, були здійснені цистеїнові мутації в положеннях 377, 378 і 556. Положення 81, 129, 422, 523, 570, 1864, 1911, 2091 і 2284 були вибрані як рівнорозташовані на BDD, щоб сайт-спрямоване ПЕГ-ілування ПЕГами великого розміру (>40 кДа) у цих положеннях разом з ПЕГ-ілуванням на нативних сайтах глікозилювання (41, 239 і 2118) і сайтах LRP-зв'язування повністю охоплювало поверхню BDD і щоб можна було ідентифікувати новий механізм виведення із кровотоку для BDD.

В одному варіанті виконання винаходу середовище для культивування клітин містить цистеїни, які "кепують" цистеїнові залишки в мутеїні за допомогою утворення дисульфідних зв'язків. При приготуванні кон'югата цистеїновий мутеїн, продукований у рекомбінантній системі, кепують цистеїном із середовища культивування та цей кеп видаляють шляхом м'якого відновлення, що звільняє кеп, перед додаванням цистеїн-специфічного полімерного реагенту. Інші методи, відомі в цій галузі для сайт-специфічної мутації FVIII, також можуть використовуватись, оскільки вони очевидні для фахівця в цій галузі.

#### Приклади

Аналіз активності структурних зв'язків FVIII. FVIII і BDD-FVIII є дуже великими складними молекулами з багатьма різними сайтами, залученими в біологічні реакції. Попередні спроби ковалентно модифікувати їх, щоб поліпшити фармакокінетичні властивості, мали суперечливі результати. Те, що молекули можна було специфічно мутувати, а потім у сайт-специфічний спосіб додавати полімер, було несподіваним. Крім того, несподіваними були також результати в поліпшенні фармакокінетичних властивостей і збереженні активності, беручи до уваги, що раніше відомим полімерним кон'югатам були притаманні проблеми виникнення неспецифічного збільшення та зменшення активності.

В одному варіанті виконання винаходу передбачається сайт-спрямований мутагенез із використанням цистеїн-специфічних лігандів, таких як ПЕГ-малеїмід. Немутований BDD не має будь-яких цистеїнів, доступних для реагування з ПЕГ-малеїмідом, так що тільки мутоване положення цистеїну було б сайтом ПЕГ-ілування. Більш конкретно, BDD-FVIII містить 19 цистеїнів, 16 з яких утворюють дисульфідні та інші 3 з яких є вільними цистеїнами (McMullen et al., 1995, Protein Sci. 4, pp. 740-746). Структурна модель BDD передбачає, що всі 3 вільні цистеїни перебувають усередині структури (Stoliva-McPhie et al., 2002, Blood 99, pp. 1215-1223). Оскільки окислені цистеїни не можуть

бути ПЕГ-іловані ПЕГ-малеїмідами, то 16 цистеїнів, які утворюють в BDD дисульфіді, не можуть бути ПЕГ-іловані, поки спочатку не будуть відновлені. На підставі структурної моделі BDD 3 вільні цистеїни в BDD не можуть бути ПЕГ-іловані без попередньої денатурації протеїну, щоб ці цистеїни стали доступними ПЕГ-реагенту. Таким чином, неочевидною є можливо досягти специфічного ПЕГ-ілування BDD ПЕГ-ілуванням на нативних цистеїнових залишках без істотної зміни структури BDD, що, досить ймовірно, приведе до порушення його функції.

Окислювально-відновний стан 4-х цистеїнів у В-доміні FVIII повної довжини невідомий. ПЕГ-ілування 4-х цистеїнів у В-доміні може бути можливим, якщо вони не утворюють дисульфідів і розташовані на поверхні структури. Однак, оскільки повнорозмірна FVIII і BDD мають подібний фармакокінетичний (PK) профіль і подібні періоди напіввиведення *in vivo* (Gruppo et al., 2003, Haemophilia 9, pp. 251-260), те малоймовірно, що ПЕГ-ілування В-доміну приведе до поліпшення періоду напіввиведення із плазми, якщо тільки не виявиться, що ПЕГ також захищає області, що не належать до В-доміну.

Щоб попередньо визначити сайт поліпептиду, що має активність FVIII, для приєднання полімеру, який збереже активність фактора VIII і поліпшить фармакокінетику, пропонуються такі рекомендації, основані на BDD-FVIII. Модифікації повинні бути спрямовані на механізми виведення, інактивації та імунотоксичності механізми, такі як LRP, HSPG, APC, і на сайти зв'язування інгібіторних антитіл. Структура BDD показана в Stoilova-McPhie, S. et al., 2002, Blood 99(4), pp. 1215-23. Наприклад, щоб пролонгувати період напіввиведення, можна ввести одиничний ПЕГ у специфічний сайт на або поблизу сайтів LRP-зв'язування в інтервалі залишків 484-509 домену A2 і в інтервалі залишків 1811-1818 домену A3. Введення об'ємного ПЕГ у ці сайти має перервати здатність FVIII зв'язуватися з LRP і зменшити виведення FVIII із кровотоку. Передбачається також, що для пролонгування періоду напіввиведення без значного впливу на активність ПЕГ може бути введений на залишок 1648, що перебуває на сполученні В-доміну та А3-доміну в молекулі повної довжини, і в 14-амінокислотний лінкер I BDD між доменами A2 і A3.

Специфічність ПЕГ-ілування можна досягти шляхом введення одиничних цистеїнових залишків у домени A2 або A3, використовуючи методики мутагенезу за допомогою рекомбінантних ДНК, застосовуючи після цього сайт-специфічне ПЕГ-ілування введеного цистеїну за допомогою цистеїн-специфічного ПЕГ-реагенту, такого як ПЕГ-малеїмід. Інша перевага ПЕГ-ілування на залишках 484-509 і 1811-1818 полягає в тому, що ці два епітопи представляють два із трьох головних класів інгібіторних антигенних сайтів у пацієнтів. Для досягнення максимального ефекту поліпшення періоду напіввиведення із кровотоку та зменшення імунотоксичної відповіді можна ПЕГ-ілувати як A2, так A3 сайти LRP-зв'язування, щоб одержати диПЕГ-ілований продукт. Слід зазначити, що ПЕГ-ілування усередині області 1811-1818 може приз-

вести до значної втрати активності, тому що ця область залучена також у зв'язування FIX. Сайт-спрямоване ПЕГ-ілування усередині області 558-565 має усунути HSPG зв'язування, однак, може також знизити активність, оскільки ця область також зв'язується з FIX.

Щоб ідентифікувати новий механізм виведення FVIII, можна також ПЕГ-ілувати додаткові сайти на його поверхні. ПЕГ-ілування домену A2 може надати додаткову перевагу в тому, що домен A2 дисоціює від FVIII після активації та, ймовірно, вилучається із кровотоку швидше, ніж залишок молекули FVIII, через його менший розмір. З іншого боку, ПЕГ-ілований A2 може виявитися досить великим, щоб уникнути виведення нирками, і мати період напіввиведення із плазми, порівнянний з таким для залишку FVIII і, таким чином, можна відновити активований FVIII *in vivo*.

Ідентифікація сайтів ПЕГ-ілування в областях A2 і A3. П'ять положень (Y487, L491, K496, L504 і Q468, що відповідають положенням PEG 1-5) в або поблизу передбачуваної області LRP-зв'язування A2 були вибрані як приклади сайт-спрямованого ПЕГ-ілування, ґрунтуючись на поверхневому розташуванні та напрямку у зовнішній бік траєкторії C $\alpha$ -C $\beta$ . Крім того, ці залишки приблизно рівновіддалені один від одного в просторовій структурі молекули, тому разом вони можуть представляти цілу область. Вісім положень (1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803, 1804, що відповідають PEG6-14) в або поблизу передбачуваної області LRP-зв'язування A3 були вибрані як приклади для проведення сайт-спрямованого ПЕГ-ілування. ПЕГ6 (K1808) межує з 1811-1818 і природним N-зв'язаним сайтом глікозилювання в положенні 1810. ПЕГ-ілування в положенні 1810 (ПЕГ7) приводить до заміщення цукру на ПЕГ. Мутація в положенні T1812 ПЕГ8 також ліквідує сайт глікозилювання. Хоча, як передбачувалося, ПЕГ9-положення (K1813) спрямоване всередину структури, воно було вибране на випадок, якщо модель структури є неправильною. ПЕГ10 (Y1815) є об'ємною гідрофобною амінокислотою усередині петлі LRP-зв'язування та може бути основним залишком взаємодії, оскільки гідрофобні амінокислоти звичайно перебувають у центрі протеїн-протеїнових взаємодій. Оскільки область 1811-1818, як було зазначено, бере участь у зв'язуванні як LRP, так і FIX, то було зроблене припущення, що ПЕГ-ілування усередині цієї петлі може призвести до зниженої активності. У зв'язку із цим, поблизу петлі 1811-1818, але не усередині її, були сконструйовані ПЕГ11-ПЕГ14 (1795, 1796, 1803, 1804), щоб стала можливою дисоціація зв'язування LRP і FIX з ПЕГ різних розмірів.

Щоб одночасно блокувати обидва сайти LRP-зв'язування, можна здійснити подвійне ПЕГ-ілування, наприклад, у положеннях ПЕГ2 і ПЕГ6.

Тому що область 558-565, як було показано, зв'язується як з HSPG, так і з FIX, усередині цієї області сайти не створювалися. Замість цього, між областями LRP-і HSPG-зв'язування A2 були сконструйовані ПЕГ15-ПЕГ17 (377, 378 і 556), щоб приєднаний ПЕГ міг як перешкоджати взаємодіям так і переривати можливі взаємодії між ними. Додаткові

сайти, які розташовані на поверхні та спрямовані назовні, могли б бути вибрані усередині або поблизу областей LRP- і HSPG-зв'язування. Щоб ідентифікувати нові механізми виведення, можна систематично ПЕГ-ілувати FVIII. На додаток до ПЕГ1-17 у якості прив'язувальних точок для ПЕГ-ілування можна використати три інші природні сайти глікозилювання, а саме N14, N239 і N2118, що відповідають ПЕГ18-20, оскільки вони повинні бути розташовані на поверхні. На BDD-моделі на додаток до сайтів функціональної взаємодії для vWF, FIX, FX, фосфоліпиду та тромбіну були картовані області поверхні в радіусі 20 ангстрем від С $\beta$ -атомів ПЕГ2, ПЕГ6, а також чотири сайти глікозилювання.

Потім, ґрунтуючись на їх можливості охоплювати майже повністю поверхню BDD, що залишається, з радіусом 20 ангстрем від кожного з їх С $\beta$ -атомів, були вибрані ПЕГ21-29, що відповідають Y81, F129, K422, K523, K570, N1864, T1911, Q2091 і Q2284. Оскільки ці положення повністю розташовані на поверхні, є спрямованими назовні та перебувають далеко від природних цистеїнів, вони також були вибрані, щоб мінімізувати можливі некоректні утворення дисульфідів. Радіус 20 ангстрем був вибраний тому що, передбачається, що великий ПЕГ, такий як розгалужений ПЕГ 64 кДа, має можливість охопити сферу з радіусом близько 20 ангстрем. ПЕГ-ілування ПЕГ21-29 разом з ПЕГ2 і ПЕГ6 і сайтами глікозилювання ПЕГ18, 19 і 20 ймовірно захистить майже повністю нефункціональну поверхню FVIII.

Положення ПЕГ-ілування, які приводять до покращених властивостей, таких як поліпшений РК-профіль, більше висока стабільність або зменшення імуногенності, можуть бути скомбіновані, щоб одержати мультиПЕГ-ілований продукт із максимально поліпшеними властивостями. ПЕГ30 і ПЕГ31 були сконструйовані за допомогою видалення дисульфідів, розташованих на поверхні A2- і A3-доменів, відповідно. Для проведення ПЕГ-ілування ПЕГ30, або C630A повинен бути звільнений від свого дисульфідного партнера C711. Також, ПЕГ31, C1899A повинні дати можливість C1903 бути ПЕГ-ілованим.

Мутагенез. Субстрати для сайт-спрямованого ПЕГ-ілування FVIII можуть бути створені введенням цистеїнового кодона в сайт, вибраний для ПЕГ-ілування. Для одержання всіх ПЕГ-мутантів використовували набір для сайт-спрямованого мутагенезу Stratagene cQuickChange™ II (набір Stratagene 200523 від Stratagene Corporation, Ла Йола, Каліф.). Метод сайт-спрямованого мутагенезу cQuickChange™ здійснювали, використовуючи PfuTurbo® Днк-полімеразу та температурний цикл. Два комплементарні олігонуклеотидні праймери, що містять бажану мутацію, елонгували, використовуючи PfuTurbo, що не зміщає праймери. Як матрицю використовували двониткову ДНК, що містить ген FVIII дикого типу. Після множини циклів елонгації продукт розщеплювали ендонуклеазою DpnI, що є специфічною до метилованої ДНК. Новосинтезована ДНК, що містить мутацію, не була метилованою, у той час як батьківська ДНК дикого типу була метилованою. Роз-

щеплену ДНК потім використовували для трансформації супер-компетентних XL-1 Blue клітин.

Ефективність мутагенезу склала майже 80%. Реакції мутагенезу здійснювали або в pSK207+BDD C2.6, або в pSK207+BDD (Фігура 1). Успішний мутагенез підтверджувався ДНК-секвенуванням, і підхожі фрагменти, що містять мутацію, включалися в основну ділянку вектора експресії ссавців pSS207+BDD, що кодує FVIII. Після введення всі мутації знову підтверджувалися секвенуванням. Для A3-мутантів ПЕГ 6, 7, 8, 9 і 10 мутагенез проводили у векторі pSK207+BDD C2.6. Після підтвердження секвенуванням мутантний фрагмент KpnI/Pme субклонували в pSK207+BDD. BDD-мутант потім субклонували в експресувальний вектор pSS207+BDD. Для A3-мутантів ПЕГ 11, 12, 13, 14 мутагенез проводили безпосередньо у векторі pSK207+BDD, і підтверджений секвенуванням мутант BDD потім субклонували в pSS207+BDD. Для A2-мутантів ПЕГ 1, 2, 3, 4 і 5 мутагенез проводили у векторі pSK207+BDD C2.6. Підтверджений секвенуванням мутант субклонували в pSK207+BDD, а потім в pSS207+BDD.

Праймери (тільки смислова нитка), використані для мутагенезу, зазначені для кожної реакції:

ПЕГ1, Y487C:  
GATGTCCGTCCTTTGTGCTCAAGGAGATTACCA  
(SEQ ID NO:5)

ПЕГ2, L491C:  
TTGTATTCAAGGAGATGCCCCAAAGGTGTAAAC  
(SEQ ID NO:6)

ПЕГ3, K496C:  
TTACCAAAAGGTGTATGCCATTTGAAGGATTTTC  
(SEQ ID NO:7)

ПЕГ4, L504C:  
AAGGATTTTCCAATTTGCCAGGAGAAATATTC  
(SEQ ID NO:8)

ПЕГ5, Q468C:  
GATTATATTTAAGAATTGCGCAAGCAGACCATAT  
(SEQ ID NO:9)

ПЕГ6, K1808C:  
TAGAAAAAACTTTGTCTGCCCTAATGAAA-  
CAAAAC (SEQ ID NO: 10)

ПЕГ7, N1810C:  
AACTTTGTCAAGCCTTGCGAAACCAAACTTAC  
(SEQ ID NO:11)

ПЕГ8, T1812C:  
GTCAAGCCTAATGAATGCAAACTTACTTTTGGGA  
(SEQ ID NO:12)

ПЕГ9, K1813C:  
CAAGCCTAATGAAACCTGCACTTACTTT?-  
TGGAAG (SEQ ID NO:13)

ПЕГ 10, Y1815C:  
СТААТGAAACCAAACTTGCTTTTGGAAA-  
TGCAAC (SEQ ID NO:14)

ПЕГ11, D1795C:  
ATTTCTTATGAGGAATGCCAGAGGCAAGGAGCA  
(SEQ ID NO:15)

ПЕГ12, Q1796C:  
TCTTATGAGGAAGATTGCAGGCAAGGAGCAGAA  
(SEQ ID NO:16)

ПЕГ13, R1803C:  
CAAGGAGCAGAACCTTGCAAAAACTTTG?-  
TCAAGCCT (SEQ ID NO:17)

ПЕГ14, K1804C:  
GGAGCAGAACCTAGATGCAACTTTGTCAAGCCT  
(SEQ ID NO:18)

ПЕГ15, K377C:  
CGCTCAGTTGCCAAGTGTATCCTAAACTTGG  
(SEQ ID NO:19)

ПЕГ16, H378C:  
TCAGTTGCCAAGAAGTGTCTAAACTTGGGTA  
(SEQ ID NO:20)

ПЕГ17, K556C:  
CTCCTCATCTGCTACTGCGAATCTGTAGATCAA  
(SEQ ID NO:21)

ПЕГ18, N41C:  
CAAAATCTTTTCCATTCTGCACCTCAGTCGTGTAC  
(SEQ ID NO:22)

ПЕГ19, N239C:  
GTCAATGGTTATGTATGCAGGTCTCTGCCAGGT  
(SEQ ID NO:23)

ПЕГ20, N2118C:  
CAGACTTATCGAGGATGTTCCACTGGAACCTTA  
(SEQ ID NO:24)

ПЕГ21, Y81C:  
ATCCAGGCTGAGGTTTGTGATACAGTGGTCATT  
(SEQ ID NO:25)

ПЕГ22, F129C:  
GAAGATGATAAAGTCTGTCCTGGTGAAGCCAT  
(SEQ ID NO:26)

ПЕГ23, K422C:  
CAGCGGATTGGTAGGTGTTACAAAAAGTCCGA  
(SEQ ID NO:27)

ПЕГ24, K523C:  
GAAGATGGGCCAACTTGCTCAGATCCTCGGTGC  
(SEQ ID NO:28)

ПЕГ25, K570C:  
CAGATAATGTCAGACTGCAGGAATGTCATCCTG  
(SEQ ID NO:29)

ПЕГ26, N1864C:  
CACASTAACACACTGTGTCCTGCTCATGGGAGA  
(SEQ ID NO:30)

ПЕГ27, T1911C,  
CAGATGGAAGATCCCTGCTTTAAAGAGAATTAT  
(SEQ ID NO:31)

ПЕГ28, Q2091C:  
ACCCAGGGTGCCCGTTGCAAGTTCTCCAGCCTC  
(SEQ ID NO:32)

ПЕГ29, Q2284C:  
AAAGTAAAGGTTTTTTCGGAAATCAAGACTCC  
(SEQ ID NO:33)

ПЕГ30, C630A:  
TTGCAGTTGTGCTGCTTTGCATGAGGTGGCA  
(SEQ ID NO:34)

ПЕГ31, C1899A:  
AATATGGAAGAAACGCTAGGGCTCCCTGCAAT(  
SEQ ID NO:35).

Експресія мутеїну. Після введення у вектор, що надає стійкість до Гігроміцину В (Гігр В), ПЕГ-мутеїни були трансфеговані в НКВ11-клітини (Патент США 6,136,599), змішані з Реагентом для Трансфекції 293 Фектин (Invitrogen Corp. кат. № 12347-019) за інструкціями виробника. Експресію FVIII у тридобовий посттрансфекційний період оцінювали за допомогою хромогенного аналізу Коатест (Chromogenix Corp. кат. № 821033, див. Приклад 12, хромогенний аналіз) (Таблиця 1). Потім трансфеговані клітини приміщували при селективній дії 50 мкг/мл Гігр В у середовище зростання, доповнене 5% ембріональною бичачою сироваткою (FBS). Після появи стійких до Гігр В колоній їх збирали та скринували на експресію FVIII за допомогою хромогенного аналізу Коатест. Потім стабільні експресувальні FVIII клітини вносили в середовище, що містить домішку HSPG. Клітини вирощували та висівали в концентрації 1 X 10<sup>6</sup> клітин/мл у качалкові колби зі свіжим вищем. Культуральну рідину (TCF), зібрану по кінченні 3 діб, використовували для очищення FVIII BDD-мутеїнів. Активність FVIII з TCF аналізували за допомогою Коатесту (Таблиця 1).

Таблиця 1

Рівень експресії ПЕГ-мутеїнів при транзйентній і стабільній трансфекціях

## Сумарні титри ПЕГ-мутеїнів

Мутація	ID Мутеїну	Титр (МО/мл)	
		Транзйент.	Стаб. Клітини
Y487C	ПЕГ1	0,07	N/A
L491C	ПЕГ2	0,60	1,96
K496C	ПЕГ3	0,45	N/A
L504C	ПЕГ4	0,38	5,57
Q468C	ПЕГ5	0,69	8,14
K1808C	ПЕГ6	0,54	2,73
N1810C	ПЕГ7	0,21	0,5
T1812C	ПЕГ8	0,16	N/A
K1813C	ПЕГ9	0,35	7,74
Y1815C	ПЕГ10	0,09	N/A
D1795C	ПЕГ11	0,27	N/A
Q1796C	ПЕГ12	0,29	N/A
R1803C	ПЕГ13	0,11	N/A
K1804C	ПЕГ14	0,18	1,14
L491C/K1808C	ПЕГ2+6	0,11	2,48
L491C/K1804C	ПЕГ2+14	0,13	7,19
K377C	ПЕГ15	0,11	12,58
H378C	ПЕГ16	0,15	0,97
K556C	ПЕГ17	0,09	0,15
N41C	ПЕГ18	0,05	N/A
N239C	ПЕГ19	0,16	N/A
N2118C	ПЕГ20	0,13	N/A
Y81C	ПЕГ21	0,36	N/A
F129C	ПЕГ22	0,25	2,55
K422C	ПЕГ23	0,28	N/A
K523C	ПЕГ24	<0.05	N/A
K570C	ПЕГ25	<0.05	N/A
N1864C	ПЕГ26	0,15	N/A
T1911C	ПЕГ27	0,28	N/A
Q2091C	ПЕГ28	0,20	N/A
Q2284C	ПЕГ29	0,17	N/A
C630A	ПЕГ30	<0.05	0,20
C1899A	ПЕГ31	0,30	1,80

(N/A = аналіз не проводився).

Очищення мутеїнів. Після збирання супернатанта клітинної культури, що містить секретований мутеїновий протеїн FVIII, супернатант фільтрували крізь 0,2-мікронний мембранний фільтр, щоб видалити всі клітини, що залишилися. Потім супернатант концентрували або за допомогою ультрафільтрації, або за допомогою аніонного обміну. Потім його направляли на імуноафінну колонку, де компоненти середовища культивування клітин і більшість домішкових протеїнів хазяйських клітин вилучались. Потім елюат з імуноафінної колонки буферували діафільтрацією у буферний склад, що містить сахарозу, та заморожували. Вихід і збір протеїну через колонку з моноклональними до FVIII антитілами оцінювали хромогенним аналізом. Зразки навантажених,

різних елюйованих фракцій, що протікають через колонку, смуги та діафільтрованого елюату хроматографічного дослідження були проаналізовані на FVIII-активність (Таблиця 2). Таблиця 2 показує збір ПЕГ2-мутеїну з колонки з моноклональними антитілами. Антитіла являють собою антитіла C7F7. Відсоток збору в Таблиці 2 визначений за допомогою хромогенного аналізу. Кінцевий вихід становив 73%. На Фігурі 2 показаний графік UV-поглинання при 280 нм відносно часу для ПЕГ2-протеїну, очищеного через хроматографічну колонку з моноклональними антитілами до FVIII. Хроматографію здійснювали з використанням хроматографічної системи AKTA® Explorer 100 від Amersham Bioscience. У цій системі використовується багатохвильовий UV-Visible монітор

і пропускна комірка 2 мм. ПЕГ2-мутеїн елююваний з колонки в присутності вищої солі, і пік елюю-

вання вказується як поглинанням при 280 нм, так аналізом активності FVIII.

Таблиця 2

Збір ПЕГ2-мутеїну з колонки з моноклональними антитілами до FVIII

Етап	% відновлення
C7F7 навантажений	100
C7F7 у потоці	1,1
C7F7 промитий	0,2
C7F7 елюат	86
C7F7 смуга	0,0
C7F7 UF/DF	73

Пегілування. Нативний FVIII повної довжини або BDD не може бути ПЕГ-ілований цистеїн-специфічними ПЕГ без відновлення та денатурації при більш ніж 100-кратному надлишку ПЕГ: протейнове співвідношення (дані не показані), підтверджує гіпотезу, засновану на моделі структури BDD, що всі нативні цистеїни утворюють дисульфіди або перебувають усередині FVIII. Цистеїнові FVIII-мутеїни, експресовані та очищені з використанням зазначених вище стандартних протоколів, не могли б бути ПЕГ-іловані цистеїн-специфічним ПЕГ-малеїмідним реагентом, можливо, тому, що введений FVIII-цистеїн кепований за допомогою реакції із сульфгідрильними групами, такими як цистеїн і β-меркаптоетанол, присутніми в середовищі росту клітин. Це питання потенційно може бути вирішене елімінуванням цистеїнів і β-меркаптоетанолу із середовища культивування, але це може призвести до зниження продукції FVIII, і не перешкоджало б сульфгідрилам, що вивільняються клітинами, блокувати введений FVIII-цистеїн.

В іншому аспекті винаходу був розроблений тристадійний метод, що дає можливість сайт-специфічного ПЕГ-ілування FVIII (Фігура 3). На стадії 1 очищений цистеїновий FVIII-мутеїн у кількості близько 1 мкМ м'яко відновлювали відновлювачами, такими як приблизно 0,7 мМ Трис(2-кабоксіетил)фосфіну (TCEP) або 0,07 мМ дитіотреїтолу (DTT) протягом 30 хвилин при 4°C, щоб відокремити "кеп". На стадії 2 відновлювач видаляли разом з "кепом" за допомогою методу гель хроматографії (SEC), такого як проходження зразка через обертову колонку (BioRad®), щоб дати можливість дисульфідам FVIII реформуватися, залишаючи при цьому введений цистеїн вільним і відновленим. На стадії 3, через, принаймні, 30 хвилин після видалення відновлювача, вивільнений цистеїновий FVIII-мутеїн обробляли, принаймні, 10-кратним молярним надлишком ПЕГ-малеїмиду із розмірами в інтервалі від 5 до 64 кДа

(Nektar Therapeutics і N.O.F. Corporation) протягом, принаймні, 1 години при 4°C. Цей метод дає профіль продукту, що добре погоджується з відтворюваними даними для множини реакцій, повторених різними дослідниками.

Через те, що метод обертової колонки для видалення TCEP не є масштабним, була вибрана гель-фільтраційна хроматографія зі знесоленням. Однак після перевірки цього методу з використанням зразка, міченого TCEP, було показано, що TCEP елюювався у вимірюваній кількості в пори колонки та непрямо в сольову фракцію, як це очікувалося б від молекули з низькою молекулярною вагою. Вестерн-блот аналіз показав значний фон ПЕГ-ілування, імовірно, внаслідок неповного вилучення TCEP. В окремих проміжних експериментах було показано, що очищений C7P7-матеріал міг би бути істотно очищений надалі від інших домішкових протейнів використанням середовища аніонообмінної хроматографії, комбінованої із сольовим градієнтом. Потім було вирішено відновити C7F7-матеріал за допомогою TCEP, як описано вище, і потім обробити цей матеріал через аніонообмінну колонку. Внаслідок відмінності в заряді, FVIII-протейн утримувався би, у той час як TCEP протікав би через колонку і не залишався. У той самий час протягом елюювання в сольовому градієнті FVIII-протейн очищувався б від більшості домішкових протейнів, що залишилися. Це означає, що пізніше здійснюване ПЕГ-ілування було б теоретично більш гомогенним при більш чистому вихідному матеріалі. Однак після тестування за допомогою зразка, міченого TCEP, було показано, що виміряні рівні TCEP виявлялися елююваними в градієнті з FVIII. Тому було вирішено після аніонообмінної хроматографії застосувати гель-фільтраційну хроматографію зі знесоленням, щоб ці дві стадії, послідовно використані, приводили до повного видалення TCEP і виключення неспецифічного ПЕГ-ілування.



Аналіз пегілування методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) і вестерн-блотинга. ПЕГ-ілований продукт може бути проаналізований за допомогою електрофорезу на відновлювальному 6% ТрисГліцин SDS-поліакриламідному гелі (Invitrogen). При продовженні електрофорезу гель може бути забарвлений Кумасі Блакитним (Coomassie Blue) для ідентифікації всіх протеїнів або піддаватись стандартному Вестерн-блот протоколу для ідентифікації малюнка ПЕГ-ілування в різних областях FVIII. Забарвлення блята мишачим моноклональним антитілом R8B12 або C7F7, створеним до С-кінцевої області важкого ланцюга FVIII або N-кінцевої області легкого ланцюга FVIII, відповідно, має ідентифікувати ПЕГ-ілування відповідних ланцюгів. Забарвлення за допомогою 413-антитіла до області 484-509 FVIII повинно визначити, чи є ПЕГ-ілування дійсно сайт-специфічним, чи ні, для мутеїнів, таких як ПЕГ1-4. Аналогічно, забарвлення за допомогою антитіла CLB-CAg A, що розпізнає область 1801-1823 FVIII, повинне визначити, чи є ПЕГ-ілування дійсно сайт-специфічним, чи ні, для мутеїнів, таких як ПЕГ6-10.

Було показано, що ПЕГ-ілування ПЕГ2 (L491C) є вибірковою для важкого ланцюга відносно легкого ланцюга та особливо вибірковою для області 484-509 (Фігура 4), у той час як ПЕГ6 (K1808C), як було показано, є вибірковою для легкого ланцюга відносно важкого ланцюга (Фігура 5).

Для дослідження, зображеного на Фігурі 4, ПЕГ2-мутеїн (доріжки 1 і 8) відновлювали за допомогою ТСЕР, після чого ТСЕР вилучали (доріжки 2 і 9) і обробляли за допомогою 5-, 12-, 22-, 33- або 43-кДа ПЕГ-малеїмиду (доріжки 3-7 і 10-14). НеПЕГ-ілований FVIII досліджувався у вигляді необробленої (H+L) і обробленої смуг важкого (H) і легкого (L) ланцюгів. Всі три смуги виявляються на гелі, забарвленому Кумасі Блакитним (внизу праворуч), у той час як Western-забарвлення специфічними до ланцюга антитілами показало тільки ланцюг, що не прореагував, та відповідний ланцюг. При забарвленні R8B12 (вгорі ліворуч) смуга важкого ланцюга (H) сильно зменшувалася в інтенсивності, коли ПЕГ2 обробляли ПЕГ-малеїмідом, і створювалася нова смуга, що виявлялася вищою, ніж батьківська H-смуга, пропорційно розміру ПЕГ. При забарвленні C7F7 (внизу ліворуч) смуги легкого ланцюга (L) (численні смуги внаслідок гетерогенного глікозилювання) не змінювалися в інтенсивності. Необроблена H+L смуга в обох забарвленнях зсунута, оскільки H-ланцюг є частиною необробленого FVIII. Забарвлення Кумасі також підтверджує набагато більше ПЕГ-ілування важкого ланцюга, тобто зменшення інтенсивності H-смуги, ніж легкого ланцюга. Нарешті, ПЕГ-іловані смуги втрачають відносно більше в інтенсивності при забарвленні 413-антитілом (вгорі праворуч), ніж при забарвленні за допомогою R8B12, залежно від розміру ПЕГ, ймовірно, внаслідок сайт-специфічного ПЕГ-ілування в 491, що блокує зв'язування 413-антитіла з 484-509. Кількості

FVIII, нанесеного на доріжку, становлять близько 30 нг для двох лівих гелів, близько 1000 нг для верхнього правого гелю та близько 2000 нг для нижнього правого гелю.

Відновлення, за яким йде видалення відновлювача, не змінює міграції FVIII (доріжка 1 порівняно з доріжкою 2 і доріжка 8 порівняно з доріжкою 9). Додавання 22 кДа-ПЕГ до ПЕГ2 блокує зв'язування 413-антитіла, що погоджується зі специфічним ПЕГ-ілуванням у положенні 491 (Фігура 4, верхній правий гель). Це також передбачає, що ПЕГ-ілований ПЕГ2 буде мати більш низьку імуногенність у людини, тому що 413-антитіло, як було показано, має той самий епітоп, що й інгібіторні антитіла до A2 людини (Scandella et al., 1992, *Thromb. Haemost.* 67, pp. 665-71).

Для дослідження, зображеного на Фігурі 5, ПЕГ6-мутеїн відновлювали за допомогою ТСЕР, після чого ТСЕР вилучали (доріжки 1 і 6) і обробляли за допомогою 5-, 12-, 22- або 33 кДа-ПЕГ-малеїмиду (доріжки 2-5 і 7-10). НеПЕГ-ілований FVIII досліджувався у вигляді необробленої (H+L) і оброблених смуг важкого (H) і легкого (L) ланцюгів. З огляду на мутовані залишки ПЕГ6 (K1808) на легкому ланцюзі, ПЕГ-ілування було виявлено тільки на легкому ланцюзі, але не на важкому. Кількість FVIII, нанесеного на доріжку, становить близько 100 нг для лівого гелю та близько 30 нг для правого гелю.

BDD, що випробовувався в якості контролю, не показав будь-якого значного ПЕГ-ілування після обробки більш ніж 100-кратним молярним надлишком ПЕГ-малеїмиду, навіть після описаної вище процедури відновлення та видалення відновлювача (Фігура 6a). Цей самий метод був застосований до ПЕГ4 і ПЕГ5 (Фігура 6a). Якщо порівнювати з ПЕГ2, ці мутеїни не були ПЕГ-іловані настільки ефективно, але вони були вибірково до важкого ланцюга, подібно ПЕГ2 (L491C). Ефективність ПЕГ-ілування ПЕГ6 (K1808C) є відносно низькою, імовірно тому, що він дуже близький до сайту N-зв'язаного глікозилювання на N1810, що може блокувати ПЕГ-ілування в положенні 1808. Тому, нами був сконструйований ПЕГ7 (N1810C), щоб видалити сайт нативного глікозилювання в 1810. ПЕГ7 показує поліпшену ефективність ПЕГ-ілування порівняно з ПЕГ6, якщо порівнювати їх "голова до голови" (Фігура 6b). Аналогічно, ПЕГ 15 показує трохи кращу ефективність ПЕГ-ілування, ніж ПЕГ2. ПЕГ2+6, подвійний мутант BDD, може бути ПЕГ-ілований як на важкому, так і на легкому ланцюзі, оскільки ПЕГ2 є цистеїновою мутацією важкого ланцюга, у той час як ПЕГ6 являє собою мутацію легкого ланцюга (Фігура 6c). Цей метод був застосований також до FVIII дикого типу повної довжини (Фігура 6d). ПЕГ-ілування було виявлено для найбільшого фрагмента важкого ланцюга, що включає A1, A2 і більшу частину В-домену. Малюнок ПЕГ-ілування дає підстави вбачати моноПЕГ-ілування і наявність лише одного ПЕГ-ілованого цистеїну.

Аналіз пегілування за допомогою розщеплення тромбіном і вестерн-блотинга. ПЕГ-ілований продукт можна обробити тромбіном (40

МО/мкг FVIII) при 37°C протягом 30 хвилин. Використовуваний тромбін містить також APC у якості домішки. Розщеплення тромбіном приводить до появи 50 кДа-A1- і 43 кДа-A2-домену з важкого ланцюга, у той час як розщеплення APC приводить далі до розщеплення A2-домену на фрагменти 21 і 22 кДа (Фігура 7). Забарвлення за допомогою R8B12-антитіла, що розпізнає С-кінець важкого ланцюга, буде ідентифікувати лише інтактний A2-домен і 21 кДа-С-кінцевий фрагмент (FVIII 562-740). Таким чином, якби ПЕГ-ілування ПЕГ2 було специфічним для положення 491, 43 кДа-A2-домен повинен був би бути ПЕГ-ілованим, за винятком 21 кДа С-кінцевого фрагмента. Це було дійсно підтверджене Вестерн-блотингом для 22 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ2, показаним на Фігурі 7. Таким чином, за допомогою елімінування, ПЕГ-ілування ПЕГ2 було локалізоване на N-кінцевому 22 кДа-фрагменті (FVIII 373-561) A2-домену. Оскільки ПЕГ-малеїмід є повністю вибірконим до цистеїнів при рН 6,8 і єдині нативні FVIII-цистеїни в області 373-561 походять зі схованого дисульфіді між 528 і 554, досить імовірно, що ПЕГ2 ПЕГ-ілований на введеному цистеїні в положенні 491. Western-забарвлення обробленого тромбіном ПЕГ-ілованого ПЕГ2 за допомогою N-кінцевої частини антитіла до важкого ланцюга FVIII не показали ПЕГ-ілування A1-домену (дані не показані). Вибіркове ПЕГ-ілування ПЕГ2 з використанням методу тромбінового розщеплення було також підтверджене для ПЕГ 5, 12, 33 і 43 кДа (дані не показані). Розщеплення тромбіном ПЕГ-ілованого FVIII дикого типу повної довжини показує, що ПЕГ-ілований лише В-домен (Фігура 8).

Аналіз пегілування за допомогою забарвлення йодом. Щоб підтвердити, що нові смуги, які з'явилися, виявленням забарвленням Кумасі Блакитним і Western, дійсно є смугами, що свідчать про ПЕГ-ілування, було застосоване забарвлення йодидом барію, що є специфічним для ПЕГ (Фігура 9). ПЕГ-ілований ПЕГ2 досліджувався на 6%-ому ТрисГліциновому гелі (Invitrogen) і забарвлювався R8B12-антитілом до важкого ланцюга або розчином йодиду барію (Lee et al., Pharm Dev Technol. 1999 4:269-275). ПЕГ-іловані смуги виявлялися між двома плямами, використовуючи маркер молекулярної ваги для їх вирівнювання, підтверджуючи, таким чином, ПЕГ-ілування важкого ланцюга FVIII.

Аналіз пегілування за допомогою MALDI-мас-спектроскопії. Для підтвердження ПЕГ-ілування A2-домену у важкому ланцюзі зразок rFVIII до та після ПЕГ-ілування аналізували за допомогою мас-спектрометрії з використанням лазерної десорбції/іонізації в присутності матрикса (MALDI). Зразки змішували та кристалізували на мішеневому MALDI-планшеті з матриксом із синапінової кислоти в 30% ацетонітрилі, 0,1% TFA. Потім їх аналізували в спектрометрі Voyager DE-PRO у позитивному, лінійному режимі. Результати, подані на Фігурі 10, показали, що легкий ланцюг ПЕГ2 має центр на 83 кДа, а важкий ланцюг (HC) - на 89 кДа. Отриманий для ПЕГ-ілованого зразка спектр показав зменшення HC-піка та утворення

нового піка із центром на 111 кДа. Це підтверджує ПЕГ-ілування важкого ланцюга. Жодного ПЕГ-ілування легкого ланцюга (на 105 кДа) вище межі виявлення не спостерігалось.

Потім зразки піддавали розщепленню тромбіном при 20 одиницях тромбіну/мг FVIII при 37°C протягом 30 хвилин, і визначали концентрацію FVIII амінокислотним аналізом (Commonwealth Biotechnologies, Inc). Важкий ланцюг був розщеплений на 48 кДа (A1) N-кінцеву фракцію та 43 кДа (A2) фракцію. Отриманий MALDI-спектр для ПЕГ-ілованого зразка (Фігура 11) показує втрату піка 43 кДа та появу нового піка 65 кДа, внаслідок ПЕГ-ілованого A2-домену. ПЕГ-ілування легкого ланцюга вище межі виявлення знову не спостерігалось. Ці результати знову підтверджують ПЕГ-ілування A2-домену FVIII. Такий самий аналіз був застосований для ПЕГ-ілованого ПЕГ6 і підтвердив ПЕГ-ілування A3C1C2-фрагмента легкого ланцюга (Фігура 12).

#### Вимірювання активності

Коагуляційний аналіз. Тест-метод згортання FVIII: С являє собою одностадійний аналіз, заснований на активованому парціальному тромбластиновому часі (aPTT). У присутності Фактора IXa, кальцію та фосфоліпиду FVIII діє як кофактор у ферментативному перетворенні Фактора X на Ха. У цьому аналізі розведені тестовані зразки інкубують при 37°C із сумішшю субстрату з FVIII-дефіцитної плазми та aPTT-реагенту. До інкубованої суміші додають хлорид кальцію, і починається коагуляція. Між часом (у секундах), що потрібний для утворення згустку, і логарифмом концентрації FVIII:С існує зворотне співвідношення. Рівні активності для невідомих зразків інтерполюють, порівнюючи час згортання різних розведень тестованого матеріалу із кривою, побудованою з серій розведень стандартного матеріалу з відомою активністю, і виражають у Міжнародних Одиницях на мл (МО/мл).

Хромогенний аналіз. Метод хромогенного аналізу складається із двох послідовних стадій, де інтенсивність кольору пропорційна активності FVIII. На першій стадії Фактор X активують до FXa FIXaOM за допомогою його кофактора, FVIIIa у присутності оптимальних кількостей іонів кальцію та фосфоліпідів. Надлишкові кількості Фактора X є такими, що швидкість активування Фактора X залежить лише від кількості FVIII. На другій стадії Фактор Ха гідролізує хромогенний субстрат, даючи хромофор, і інтенсивність кольору зчитується фотометрично при 405 нм. Розраховують значення невідомого, і вірогідність аналізу перевіряється за допомогою статистичного методу тангенса кута нахилу кривої. Активність виражають у Міжнародних Одиницях на мл (МО/мл).

Петля 1811-1818 залучена у зв'язування з FIX, однак важливість індивідуальних положень усередині цієї петлі не була визначена. Мутеїни ПЕГ7-10 виявляють майже ідентичну специфічну хромогенну активність відносно нативного FVIII (Таблиця 3). Таблиця 3 показує у відсотках специфічну активність (С.А.) ПЕГ-мутеїнів і ПЕГ-ілованого ПЕГ2 або ПЕГ6 відносно BDD. С.А. визначали діленням хромогенної, коагуляційної

активності або активності vWF-зв'язування на сумарне антигенне значення ELISA (TAE). Потім С.А. ПЕГ-ілованих мутеїнів ділили на С.А. BDD (8 МО/мкг хромогенної, 5 МО/мкг коагуляційної і 1

vWF/TAE) і множили на 100, щоб одержати відсоток С.А., наведений у Таблиці 3 під заголовками "хромогенна", "коагуляційна" і "vWF/TAE".

Таблиця 3

Відсоток специфічної активності (С.А.) ПЕГ-мутеїнів і ПЕГ-ілованих ПЕГ2 і ПЕГ6 відносно BDD

	Мутація	Хромогенна	Коагуляційна	vWF/TAE
BDD		100	100	100
ПЕГ1	Y487C			
ПЕГ2	L491C	125	130	138
ПЕГ2 червоний	L491C	137	141	98
ПЕГ2-5 кДа ПЕГ	L491C	124	93	125
ПЕГ2-12 кДа ПЕГ	L491C	118	25	71
ПЕГ2-22 кДа ПЕГ	L491C	103	13	87
ПЕГ2-33 кДа ПЕГ	L491C	130	17	59
ПЕГ2-43 кДа ПЕГ	L491C	91	9	57
ПЕГ3	K496C			
ПЕГ4	L504C			
ПЕ 5	Q468C	92		
ПЕГ6	K1808C	83	60	100
ПЕ 6-33 кДа ПЕГ	K1808C	42	6	90
ПЕГ7	N1810C	100		
ПЕГ8	T1812C	100		
ПЕГ9	K1813C	83		
ПЕГ10	Y1815C	75		
ПЕГ11	D1795C			
ПЕГ12	Q1796C			
ПЕГ13	R1803C			
ПЕГ14	K1804C			
ПЕ 2+6	491C/1808C			
ПЕГ15	K377C	82		
ПЕГ16	H378C	126		
ПЕГ17	K556C	43		
ПЕГ18	N41C	80		
ПЕГ19	N239C			
ПЕГ20	N2118C	127		
ПЕГ21	Y81C			
ПЕГ22	F129C	83		
ПЕГ23	K422C			
ПЕГ24	K523C			
ПЕГ25	K570C			
ПЕГ26	N1864C			
ПЕГ27	T1911C			
ПЕГ28	Q2091C			
ПЕГ29	Q2284C			

Як показано в Таблиці 3, "ПЕГ2 червоний" - це ПЕГ2-мутеїн, що був оброблений відновлювачем з подальшим видаленням останнього. Ця процедура відновлення незначно змінює три функціональні активності FVIII. ПЕГ2-мутеїн, кон'югований з ПЕГ, що мають розмір в інтервалі від 5 кДа (ПЕГ2-5кДа) до 43 кДа (ПЕГ2-43кДа), не втрачає значної кількості хромогенної активності, але має набагато більш низьку коагуляційну активність, коли розмір ПЕГ збільшується за межі 5

кДа. Можливе також помірне зменшення vWF-зв'язування для ПЕГ-ілованого ПЕГ2 більшого розміру.

Сумарний антигенний ELISA (TAE). FVIII переносять на мікротитрувальний планшет, що покритий поліклональним антитілом до FVIII. Зв'язування FVIII виявляється за допомогою біотинілованого поліклонального антитіла до rFVIII і кон'югата стрептавідин-пероксидаза хрому (КСП). Пероксидаз-стрептавідиновий комплекс

дає колірну реакцію після додавання тетраметилбензидинового (ТМБ) субстрату. Концентрації зразків інтерполюють зі стандартної кривої, використовуючи моделі з чотирма підходящими параметрами. Результати FVIII виражають у мкг/мл.

ELISA vWF-зв'язування. FVIII давали зв'язуватися з vWF із сильно гемофільною плазмою в розчині. Потім комплекс FVIII-vWF переносили на мікротитрувальний планшет, покритий vWF-специфічним моноклональним антитілом. Зв'язування FVIII з vWF виявляється за допомогою біо-

тинізованого поліклонального антитіла до rFVIII і кон'югата стрептавідин-пероксидаза хрому (КСП). Пероксидаз-стрептавідиновий комплекс дає колірну реакцію після додавання субстрату. Концентрації зразків інтерполюють зі стандартної кривої, використовуючи моделі з чотирма підходящими параметрами. Результати FVIII-зв'язування виражають у мкг/мл. Не було виявлено будь-якого істотного впливу на кожну з активностей після ПЕГ-ілування, що погоджувалось би з ПЕГ-ілуванням у В-доміні.

Таблиця 4

Специфічна активність (С.А.) FVIII дикого типу повної довжини (KG-2) до та після ПЕГ-ілування за допомогою ПЕГ різного розміру

Зразок	TAE мкг/мЛ	Коагуляційний аналіз			Хромогенний аналіз			vWF ELISA		
		МО/мЛ	IU/ug	%Вих.	МО/мЛ	МО/мкг	%Вих.	мкг/мЛ	vWF/TAE	%Вих.
KG-2 вихідний	1,31	4,8	3,6	<b>100</b>	5,60	4,3	<b>100</b>	0,42	0,32	<b>100</b>
Лише відновлен.	0,93	3,1	3,4	<b>93</b>	4,08	4,4	<b>103</b>			
KG-2-5кДа ПЕГ	0,71	2,5	3,5	<b>96</b>	3,09	4,3	<b>102</b>			
KG-2-12кДа ПЕГ	0,59	2,3	3,9	<b>107</b>	2,99	5,0	<b>118</b>			
KG-2-22кДа ПЕГ	0,63	2,5	3,9	<b>108</b>	3,06	4,8	<b>113</b>	0,19	0,30	<b>94</b>
KG-2-30кДа ПЕГ	0,59	2,5	4,1	<b>114</b>	3,01	5,1	<b>119</b>	0,19	0,32	<b>100</b>
KG-2-43кДа ПЕГ	0,52	2,4	4,6	<b>128</b>	2,86	5,5	<b>129</b>			

Очищення ПЕГ-ілованого FVIII іонообмінною хроматографією. ПЕГ-ілований FVIII пропускають через аніон-обмінну або катіон-обмінну колонку, де протеїн зв'язується з колонкою, у той час як надлишок вільного ПЕГ-реагента не зв'язується та вилучається, проходячи через колонку. Потім ПЕГ-мутеїн елюють з колонки за допомогою градієнта хлориду натрію. Для підтвердження того, що елюйовані з колонки фракції містять ПЕГ-ілований мутеїн, використовували забарвлений йодидом барію 4-12% Біс-Трис-гель завантажених фракцій, що проходять через колонку і оброблені у градієнті.

Очищення ПЕГ-ілованого FVIII гель хроматографією. Аніон-обмінні фракції, що містять більшу частину ПЕГ2-мутеїну об'єднують і концентрують за допомогою ультрафільтрації, яку потім уводять у колонку, що використовується в гель хроматографії. Потім колонку елюють, використовуючи буферний склад. Внаслідок відмінності в розмірі та формі протеїну, залежно від того, чи зв'язаний ПЕГ із протеїном, ця колонка відокремлює ПЕГ-ілований ПЕГ2-мутеїн від кожного з інших ПЕГ2, які не є ПЕГ-ілованими. Фракції ПЕГ-ілованого FVIII-мутеїну об'єднують на підставі наявності значної активності FVIII, потім заморожують для наступних досліджень на тваринах і молекулярного дослідження. На Фігурі 13 порівнюється елюювання неПЕГ-ілованого ПЕГ2-мутеїну з елююванням 43 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ2-мутеїну. ПЕГ-ілований ПЕГ2 елює значно раніше, що вказує на збільшення його розміру та форми від ковалентно приєднаного ПЕГ.

Що стосується таких мутеїнів як ПЕГ6, які показують більш низьку ефективність ПЕГ-ілування, тобто менше 50%, то найефективнішою схемою очищення, що дає високо чистий моноПЕГ-

ілований продукт, є використання комбінації катіон-обмінної хроматографії з подальшою гель-хроматографією. Наприклад, що стосується ПЕГ6, катіон-обмінна хроматографія очищає ПЕГ-ілований ПЕГ6 (раніше елюююча фракція, Фіг. 14) від більшої частини неПЕГ-ілованого ПЕГ6 (пізніше елюююча фракція, Фіг. 15). Після цього за допомогою гель-хроматографії ПЕГ-ілований протеїн (раніше елюююча фракція, Фіг. 15) остаточно очищається від залишку неПЕГ-ілованого протеїну (пізніше елюююча фракція, Фіг. 15).

Вплив розміру ПЕГ на активність. Щоб перевірити, чи впливають розміри ПЕГ на коагуляційну та хромогенну активності FVIII після ПЕГ-ілування, очищений FVIII повної довжини, ПЕГ2, ПЕГ6 і ПЕГ14 відновлювали за допомогою ТСЕР з подальшим видаленням відновлювача та реакцією з буферним контролем або ПЕГ, що мають розмір в інтервалі від 6 кДа до 64 кДа. Отриманий ПЕГ-ілований FVIII аналізували безпосередньо, без видалення надлишку ПЕГ або неПЕГ-ілованого FVIII. Контрольні експерименти показали, що надлишок ПЕГ не впливає на активність FVIII.

На Фіг. 16 показані результати цього дослідження. Очищений FVIII повної довжини наведений на Фіг. 16 як KG-2. Відсоток активності, показаний на Фіг. 16, визначали діленням величини зразка, обробленого ПЕГ після відновлення та видалення відновлювача, на величину зразка, обробленого буферним контролем, беручи до уваги результат ПЕГ-ілування. Результат ПЕГ-ілування порівнювали з усіма ПЕГ для будь-якого даного FVIII-конструкта. Він становить приблизно 80% для KG-2, ПЕГ2 і ПЕГ14 і близько 40% для ПЕГ6. Наприклад, оброблений буферним контро-

лем ПЕГ14 має коагуляційну активність 6,8 МО/мл на відміну від 3,2 МО/мл для 12 кДа-ПЕГ-ілованого зразка ПЕГ14. Однак ефективність ПЕГ-ілування становила близько 80%, і значення 3,2 МО/мл являє собою агрегатну активність приблизно 80% ПЕГ-ілованого та 20% неПЕГ-ілованого. Вважаючи, що неПЕГ-ілований зразок має таку саму активність, що й оброблений буферним контролем ПЕГ14, відсоток активності неПЕГ-ілованого до ПЕГ-ілованому ПЕГ14 становить  $34\% = (3,2 - 6,8 \text{ рази } 20\%) / (6,8 \text{ рази } 80\%)$ .

ПЕГ-ілування усередині А2- або А3-домену в положенні ПЕГ2, ПЕГ6 і ПЕГ14 BDD веде до великої втрати коагуляційної активності, коли розмір ПЕГ збільшується за межі 6 кДа. Однак ПЕГ-ілування усередині В-домену в цистеїні В-домену нативного FVIII повної довжини не впливає на коагуляційну активність. Цікаво, що хромогенна активність всіх ПЕГ-ілованих конструктів не змінюється. Це може бути зумовлене відмінностями в аналізах. Можливо, субстрат невеликого хромо-

генного пептиду має більш легкий доступ до ПЕГ-ілованого комплексу FVIII/FIX/FX, ніж субстрат більшого протеїну, що використовується у коагуляційному аналізі. Альтернативно, ПЕГ може впливати на активацію мутеїну. Це було б легше виявити за допомогою одностадійного коагуляційного аналізу, ніж шляхом двостадійного хромогенного аналізу.

Для підтвердження ПЕГ-ефектів, що спостерігаються, на коагуляційну активність ПЕГ2, 6 і 14, кілька ПЕГ-ілованих конструктів були очищені від надлишку ПЕГ і неПЕГ-ілованого матеріалу. Оскільки ПЕГ жодним чином не впливає на хромогенну активність, відношення хромогенної активності до коагуляційної добре оцінюється за відносним впливом ПЕГ на коагуляційну активність (Таблиця 5). Більші ПЕГ у даному положенні, такі як ПЕГ2 і більша кількість ПЕГів, як у цьому випадку з конструктом ПЕГ2+6, спричиняють більш високу втрату коагуляційної активності.

Таблиця 5

Співвідношення хромогенної та коагуляційної активності для очищеного ПЕГ-ілованого BDD

ПЕГ-ілований BDD		Хромогенна МО/мл/Коагуляційна МО/мл	
ID-зразок	ПЕГ	Необроблене Відношення	Відношення відносно BDD
BDD	без ПЕГ	1,7	1
ПЕГ2 (пул 2)	22кДа 491	9	5
ПЕГ2	43кДа* 491	25	15
ПЕГ6	12кДа 1808	5	3
ПЕГ6 (колишній)	33кДа 1808	13	7
ПЕГ6 (новий)	33кДа 1808	8	5
ПЕГ2+6 (LSP25)	33кДа в 491, Моно	10	6
ПЕГ2+6 (LSP22)	33кДа в 491/1808, Ді	24	14
ПЕГ2+6 (ESP)	33кДа в 491/1808/А3, Три	60	35
ПЕГ22	64кДа* 129	14	8
ПЕГ14	12кДа 1804	3,2	1,9
ПЕГ14	20кДа* 1804	4,2	2,5
ПЕГ14	33кДа 1804	5	2,9
ПЕГ2+14 (ESP19)	33кДа в 491/1804, Ді	21	12

\* розгалужений ПЕГ.

РК дослідження кролика. Щоб зрозуміти вплив ПЕГ-ілування на фармакокінетику (РК) FVIII, РК-дослідження проводили на ряді видів. Для дослідження використовували NZW SPF-кроликів: 10 самиць, 5 кроликів у групі, 2 групи (ПЕГ2 FVIII і 22 кДа-ПЕГ-ілований ПЕГ2). Зразки розводили в стерильному PBS з кінцевою концентрацією 100 МО/мл (хромогенні одиниці). Кожному кролику вводили в крайню вушну вену дозу в 1 мл/кг (100 МО/кг) розведеної тестованої або контрольної речовини. У різний після введення час відбирали зразки крові (1 мл) в 1 мл-шприц

(наповнений 100 мкл 3,8%-ного Na-цитрату) із центральної вушної артерії в задані періоди часу після введення дози. Зразки плазми інкубували R8B12-антитілом до важкого ланцюга, приміщеним на 96-ти лунковий планшет, для специфічного захоплення людського FVIII, що вводиться. Активність захопленого FVIII визначали хромогенним аналізом (Фігура 17). ПЕГ-ілований ПЕГ2 і ПЕГ-ілований ПЕГ6 порівнювались також з BDD (Фігури 18 і 19), при цьому кількість виділених ПЕГ-ілованих мутеїнів із плазми стала більш високою порівняно з кількістю BDD. ПЕГ-ілований

FVIII дикого типу повної довжини явно не виявив такої властивості (Фігура 20).

РК дослідження миші. Як другий вид у РК дослідженнях використовували ICR-нормальні або гемофільні, FVIII-дефіцитні миші (Тасопіс, Гудзон, Нью-Й.). Нормальні миші використовувалися для дослідження; по 5 мишей у групі за один період часу. Тестовані матеріали розводили в складному буфері до номінальної кінцевої концентрації 25 МО/мл. Кожній миші вводили 4 мл/кг (~0,1 мл від загального обсягу) розведеного тестованого матеріалу через хвостову вену. Зразки крові (0,45 або 0,3 мл для дослідження нормальної або ге-

мофільної миші, відповідно) відбирали в 1 мл-шприц (наповнений 50 або 30 мкл 3,8%-ного Na-цитрату для дослідження нормальної або гемофільної миші, відповідно) з нижньої порожньої вени в заданий період часу (одна тварина на зразок). Зразки плазми аналізували на концентрацію FVIII, використовуючи описаний вище метод хромогенного аналізу. Більша кількість ПЕГ-ілованого ПЕГ6 виділяється із плазми порівняно з BDD або ПЕГ6 (Фігура 21). Більша кількість ПЕГ-ілований ПЕГ2 виділяється із плазми порівняно з BDD (Фігури 22 і 23).

Таблиця 6

Підсумкові результати РК-дослідження ПЕГ-ілованого FVIII, що показують період напіввиведення із плазми в годинах

Конструкт	Період напіввиведення, ч	Види
BDD	6.6	Нормальний кролик
ПЕГ2	4.8	Нормальний кролик
ПЕГ2-22кДа ПЕГ	7.5	Нормальний кролик
ПЕГ2-43кДа ПЕГ	8.0	Нормальний кролик
ПЕГ6-12кДа ПЕГ	8.2	Нормальний кролик
ПЕГ6-33кДа ПЕГ *	9.6	Нормальний кролик
ПЕГ6-33кДа ПЕГ	17.4	Нормальний кролик
BDD	4.5	Нормальна миша
ПЕГ2-22кДа ПЕГ	7.3	Нормальна миша
ПЕГ6-12кДа	5.3	Нормальна миша
ПЕГ14-33кДа ПЕГ	7.3	Нормальна миша
ПЕГ14-12кДа ПЕГ	5.5	Нормальна миша
ПЕГ22-64кДа	9.2	Нормальна миша

\*Початковий препарат 33 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ6 з періодом напіввиведення 9,6 год. у кроликів був не таким чистим, як наступний препарат, що дав період напіввиведення 17,4 год.

Таблиця 7

Збір ПЕГ-ілованих ПЕГ-мутеїнів із плазми у гемофільних мишей. Показане кількісне поліпшення збору з плазми при пост-ін'єкційному періоді 16 годин порівняно з BDD-контролем, проведеним за таких саме умов

Мутеїн	ПЕГ	Кількість разів
ПЕГ 6	12 кДа	2.9
ПЕГ 6	33 кДа	2.9
ПЕГ 2+6	33 кДа	3.3
ПЕГ 14	33 кДа	2.5
ПЕГ 2+6	33 кДа	4.4
ПЕГ 2+14	33 кДа	2.1
ПЕГ22	64 кДа	3.2

Збір (BDD) фактора VIII гемофільної миші. Гістограма збору (BDD) фактора VIII гемофільної миші, показана на Фігурі 24, ілюструє фармакокінетичну (PK) оцінку періоду напіввиведення двох видів BDD-фактора VIII в аналізі гемофільної миші. Цей аналіз був проведений для вимірювання концентрації в плазмі як BDD-фактора VIII (позначений на Фігурі 24 як "wt" або BDD-фактора VIII дикого типу), так і ПЕГ 2+6 подвійного ПЕГ-ілованого варіанта BDD-фактора VIII (і ідентифікованого тут як L491C, K1808 подвійний варіант BDD-фактора VIII) у трьох часових точках після внутрішньовенного введення в мишачу модель. У той час як оцінки для часу 0,8 і 4 годин були порівнянними, 16-годинна оцінка заслуговує на особливу увагу. Що стосується 16-и годин, то через 16 годин після введення в мишачій плазмі залишалося приблизно в чотири рази (400%) більше варіанта подвійного ПЕГ-ілованого BDD фактора VIII (ПЕГ 2+6) порівняно з неПЕГ-іловою молекулою.

Модель розриву нирки. Щоб визначити, чи є ПЕГ-іловані FVIII-мутеїни ефективними для припинення кровотечі у гемофільної миші, використовували модель розриву нирки. Гемофільну мишу (C57/BL6 з порушеним FVIII-геном) анестезували під ізофлуораном і зважували. Оголювали нижню порожню вену та вводили 100 мкл або фізіологічного розчину, або FVIII, використовуючи калібровану голку 31-го розміру. Голку акуратно видаляли та прикладали тиск до місця ін'єкції на 30-45 секунд, щоб запобігти кровотечі. Через дві хвилини, праву нирку оголювали та утримували між затисками вздовж вертикальної осі. Використовуючи скальпель №15, нирку надрізали горизонтально на глибину 3 мм. Для забезпечення рівномірності глибини пошкодження, нирку злегка притримували в середній частині, щоб оголилася однакова тканина на кожній стороні затиску. Оголену поверхню нирки розрізали до глибини затиску. Втрату крові підраховували як описано вище. Для визначення співвідношення дози та відповіді FVIII на ниркову кровотечу на мишах тестували різні дози FVIII. ПЕГ-ілований ПЕГ2 показує порівнянну з BDD активність зменшення втрати крові після пошкодження нирки миші (Фігура 25). Таким чином, хоча коагуляційна активність ПЕГ-ілованого ПЕГ2 нижча, ніж у BDD, ця модель розриву нирки показує, що ефективність *in vivo* ПЕГ-ілованого ПЕГ2 не була помітно знижена порівняно з BDD, що погоджується з даними хромогенного аналізу.

Аналіз інгібування антитілами. Додавання полімеру з високою молекулярною вагою, такого як поліетиленгліколь (ПЕГ), специфічно в положення 491 (тобто ПЕГ2) повинно зменшувати зв'язування з і чутливість до mAB 413, значною мірою збільшуючи частку інгібіторних антитіл у пацієнтів, оскільки в багатьох пацієнтів виробляються інгібіторні антитіла до цього ж епітопу mAB 413. Щоб перевірити це, кількості mAB 413, що збільшуються, інкубували з кількостями, що не насичують (0,003 МО/мл), BDD або 43 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ2 і тестували на функціональну

активність хромогенним аналізом (Фігура 26). В якості контролю використовували R8B12, не-інгібіторне антитіло, і ESH4, інгібіторне антитіло, націлене на C2-домен. ПЕГ-ілований ПЕГ2 дійсно більш стійкий до інгібування mAB 413, ніж BDD, і показує подібний малюнок інгібування в присутності контрольних антитіл, які не зв'язуються поблизу положення 491. Крім того, захисний ефект ПЕГ проти інгібування mAB 413 залежить від розміру ПЕГ, при цьому чим крупніший ПЕГ, тим сильніший ефект (Фігура 27). Щоб перевірити, чи є ПЕГ-ілований FVIII більш стійким до інгібіторних антитіл у пацієнтів, хромогенну активність вимірювали в присутності ряду вибраних зразків плазми, що походить від пацієнтів з гемофілією А, у яких виробилися інгібітори до FVIII. В 8 протестованих зразках плазми пацієнтів, 43 кДа-ПЕГ-ілований ПЕГ2 був більш стійким до інгібування плазми пацієнтів, ніж BDD в 4 зразках плазми пацієнтів. Наприклад, ПЕГ-ілований ПЕГ2, ПЕГ6 або ПЕГ2+6 показали більш високу залишкову активність, ніж BDD у плазмі одного пацієнта порівняно з іншою плазмою (Фігура 28). ДипЕГ-ілований ПЕГ2+6, очевидно, є більш стійким, ніж моноПЕГ-ілований ПЕГ2 або ПЕГ6. Ці результати дають підстави вважати, що ПЕГ-іловані ПЕГ-мутеїни можуть бути більш ефективними при лікуванні пацієнтів, у яких виробляються інгібітори до FVIII.

Високопродуктивний скринінг пегілування. Ефективність ПЕГ-ілування конкретного ПЕГ-мутеїну непередбачувана, особливо через те, що немає прямої структурної інформації про BDD. Наприклад, ґрунтуючись на структурній моделі BDD, можна передбачити, що ефективність ПЕГ-ілування ПЕГ4 або ПЕГ5 повинна бути дуже високою, подібно до активності ПЕГ2 і ПЕГ 15, оскільки всі три положення перебувають на поверхні та звернені назовні згідно зі структурою. Таким чином, щоб використати ПЕГ для пошуку нового механізму виведення через систематичне ПЕГ-ілування потрібно буде скринувати велику кількість мутеїнів.

Щоб швидко скринувати велику кількість ПЕГ-мутеїнів, був розроблений новий високопродуктивний метод, за допомогою якого можна перевірити ефективність ПЕГ-ілування та функціональну активність ПЕГ-ілованих продуктів від транзійтно трансфєкованих мутеїнів. Тільки 5-10 мл транзійтно експресованих ПЕГ-мутеїнів з таким малим хромогенним значенням FVIII, як 0,1-0,2 МО/мл концентрують приблизно в 50 разів, використовуючи пристрій MWCO 30K Amiconcentra Ultra, так що концентрація FVIII сягає понад 1 нМ, майже наближаючись до величини спорідненості антитіла для взаємодії з FVIII. Концентрований ПЕГ-мутеїн (~300 мкл) інкубують з ~30 мкл полімеру C7F7-антитіла до FVIII протягом ночі при 4°C, промивають, елюють, піддають діалізу та відновлюють. Відновлювач видаляють і відновлені ПЕГ-мутеїни ПЕГ-ілюють і досліджують за допомогою Western-аналізу, як описано вище (Фігури 29 і 30). Відносна ефективність ПЕГ-ілування транзійтно експресованих

ПЕГ-мутеїнів точно відповідає такій очищених ПЕГ-мутеїнів.

У такий спосіб можна скринувати багато ПЕГ-мутеїнів за один-два місяці. Наприклад, ПЕГ14 (K1804C BDD) мав, принаймні, близько 80% ПЕГ-ілування в легкому ланцюзі 12 кДа-ПЕГом і не мав ПЕГ-ілування у важкому ланцюзі (дані не показані), що погоджується з K1804C-мутацією, розташованою на легкому ланцюзі. На основі структури BDD C $\alpha$ -C $\beta$  відстань між K1804 і K1808 (ПЕГ6-положення) становить тільки 8,4 ангстрєми, і можна припустити, що введення 43 кДа-ПЕГ у це положення приведе до поліпшення РК, подібного до 33 кДа-ПЕГ-ілованого ПЕГ6 з набагато кращим результатом ПЕГ-ілування. Відносний результат ПЕГ-ілування для всіх протестованих ПЕГ-мутеїнів підсумований у Таблиці 8. ПЕГ-ілування було високо вибірковою для того конкретного ланцюга FVIII, де була введена цистеїно-

ва мутація й у якій кожний мутеїн із цистеїном у важкому ланцюзі стає ПЕГ-ілованим тільки на важкому ланцюзі, у той час як кожний мутеїн із цистеїном у легкому ланцюзі стає ПЕГ-ілованим тільки на легкому ланцюзі. Номера мутеїнів 2-31 представляють цистеїнові мутації заміщення нативної амінокислоти в BDD у положенні, позначеному цистеїном. ПЕГ2+6 є подвійним мутеїном BDD, де положення 491 і 1808 були заміщені цистеїнами. A1 і A2 (і B-домен для KG-2, FVIII повної довжини) належать до важкого ланцюга, у той час як A3, C1 і C2 належать до легкого ланцюга. Ефективність ПЕГ-ілування оцінювали шляхом дослідження ПЕГ-ілованих продуктів на SDS PAGE, порівнюючи інтенсивності ПЕГ-ілованої смуги з неПЕГ-ілованою смугою: +++ ~>80% результат ПЕГ-ілування, ++ ~30-70% результат, + ~10-30% результат і - <10% результат.

Таблиця 8

Ефективність  
ПЕГ-ілування для різних ПЕГ-ілованих FVIII

ПЕГ-мутеїн	Положення	Домен	Н-ПЕГ	Л-ПЕГ
2	491	A2	+++	-
4	504	A2	+	-
5	468	A2	+	-
6	1808	A3	-	++
ПЕГ-мутеїн	Положення	Домен	Н-ПЕГ	Л-ПЕГ
7	1810	A3	-	++
8	1812	A3	-	-
9	1815	A3	-	-
11	1795	A3	-	+
12	1796	A3	-	+
13	1803	A3	-	++
14	1804	A3	-	+++
15	377	A2	+++	-
16	378	A2	+++	-
17	556	A2	++	-
20	2118	A3	-	+
21	81	A1	++	-
22	129	A1	++	-
23	422	A2	-	-
25	570	A2	-	-
26	1864	A3	-	++
27	1911	A3	-	+++
28	2091	C1	-	++
29	2284	C2	-	+
30	711	A2	+	-
31	1903	A3	-	++
2+6	490/1808	A2/A3	+++	++
2+14	490/1804	A2/A3	+++	+++
KG-2		B	+++	-

Мас-спектрометричний аналіз відновлених ПЕГ-мутеїнів. Щоб визначити ідентичність "кепу", що запобігає прямому ПЕГ-ілуванню ПЕГ-

мутеїнів або FVIII повної довжини, ПЕГ2+14 відновлювали за допомогою ТСЕР при концентраціях в інтервалі від 67 мкМ до 670 мкМ. Результат



ПЕГ-ілування поліпшувався пропорційно збільшенню кількості ТСЕР (Фігура 31). Ті ж самі зразки аналізували також мас-спектроскопією до ПЕГ-ілування (Фігура 32). Для того, щоб одержати протеїновий домен, який можна було б вивчати безпосередньо, зразки розщеплювали тромбіном при співвідношенні 20 одиниць/мг FVIII протягом 30 хвилин при 37°C. Розщеплення тромбіном дає A2-фрагмент, що включає залишки 372-740 і не зайнятий сайтами глікозилювання. Розщеплені зразки вводили в систему рідинної хроматографії з оберненою фазою C4, і елюент з колонки вводили безпосередньо у квадрупольний часопротічний мас-спектрометр через розпилювальний інтерфейс. Мас-спектр від нижньої частини хроматографічного піка, що відповідає A2-домону,

розгортався, щоб дати значення маси інтактного протеїну. До відновлення, A2-домен ПЕГ2+14 давав масу, що на 118 дальтон більша, ніж прогнозувалось теоретично. Коли концентрація ТСЕР збільшується, з'являється новий пік, що має точну прогнозовану масу A2-домону. Частка цього нового піка зростає, при збільшенні концентрації ТСЕР. Різниця в 118 дальтон може бути віднесена на рахунок цистеїнілування на залишку Cys 491 через утворення дисульфідів із цистеїном (119 Да) і інструментальної погрішності. Таким чином, це показує, що ПЕГ-мутеїни кеповані цистеїном, що запобігає безпосередньому ПЕГ-ілуванню.

Всі розкриті тут посилання включені сюди у всій їх повноті.

## перелік послідовностей

<110> Clark, Pan  
 <120> Сайт-спрямована модифікація FVIII  
 <130> US 07430-00236  
 <150> US 60/627277  
 <151> 2004-11-12  
 <160> 35  
 <170> патент версія 3.3  
 <210> 1  
 <211> 4  
 <212> Протеїн  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> чотири перші амінокислоти послідовності В-домену людського фактора VIII

<400> 1

Ser Phe Ser Gln  
1

<210> 2  
 <211> 10  
 <212> Протеїн  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> Останні десять амінокислот послідовності В-домену людського фактора VIII

<400> 2

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg  
1 5 10

<210> 3  
 <211> 1457  
 <212> Протеїн  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Походить з послідовності людського фактора VIII  
 <400> 3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe  
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser  
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg  
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val  
50 55 60

53

95225

54

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His Leu Phe Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln  
 85 90 95  
 Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser  
 100 105 110  
 His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser  
 115 120 125  
 Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp  
 130 135 140  
 Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser  
 165 170 175  
 Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile  
 180 185 190  
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr  
 195 200 205  
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly  
 210 215 220  
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr  
 245 250 255  
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val  
 260 265 270  
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile  
 275 280 285  
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser  
 290 295 300  
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met  
 305 310 315 320  
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His  
 325 330 335

55

95225

56

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

57

95225

58

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp  
 610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val  
 625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp  
 645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe  
 660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr  
 675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro  
 690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly  
 705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp  
 725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys  
 740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu  
 755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln  
 770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu  
 785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe  
 805 810 815

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp  
 820 825 830

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln  
 835 840 845

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr  
 850 855 860

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His  
 865 870 875 880

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile  
 885 890 895  
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser  
 900 905 910  
 Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg  
 915 920 925  
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val  
 930 935 940  
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp  
 945 950 955 960  
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu  
 965 970 975  
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His  
 980 985 990  
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe  
 995 1000 1005  
 Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn  
 1010 1015 1020  
 Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys  
 1025 1030 1035  
 Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr  
 1040 1045 1050  
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr  
 1055 1060 1065  
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe  
 1070 1075 1080  
 Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met  
 1085 1090 1095  
 Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met  
 1100 1105 1110  
 Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly  
 1115 1120 1125  
 Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser  
 1130 1135 1140

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg  
 1145 1150 1155  
 Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro  
 1160 1165 1170  
 Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser  
 1175 1180 1185  
 Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro  
 1190 1195 1200  
 Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe  
 1205 1210 1215  
 Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp  
 1220 1225 1230  
 Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu  
 1235 1240 1245  
 Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn  
 1250 1255 1260  
 Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro  
 1265 1270 1275  
 Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly  
 1280 1285 1290  
 Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys  
 1295 1300 1305  
 Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn  
 1310 1315 1320  
 Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln  
 1325 1330 1335  
 Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu  
 1340 1345 1350  
 Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val  
 1355 1360 1365  
 Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys  
 1370 1375 1380  
 Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu

63

95225

64

1385

1390

1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp  
 1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr  
 1415 1420 1425

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala  
 1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr  
 1445 1450 1455

<210> 4  
 <211> 2332  
 <212> протеїн  
 <213> Homo Sapiens

<220>  
 <223> послідовність людського фактора VIII

<400> 4

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



65

95225

66

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

67

95225

68

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  
 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  
 705 710 715 720  
 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 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  
 Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg

73

95225

74

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

75

95225

76

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

77

95225

78

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> 5  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ1, що використовується для мутагенезу

<400> 5  
 gatgtccgtc ctttgtgctc aaggagatta cca

33

<210> 6  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ2, що використовується для мутагенезу

<400> 6  
 ttgtattcaa ggagatgccc aaaaggtgta aaac

34

<210> 7  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ3, що використовується для мутагенезу

<400> 7  
 ttaccaaaaag gtgtatgcca ttgaaggat tttc

34

<210> 8  
 <211> 33

<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ4, що використовується для мутагенезу

<400> 8  
aaggattttc caatttgccc aggagaaata ttc 33

<210> 9  
<211> 34  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ5, що використовується для мутагенезу

<400> 9  
gattatattt aagaattgcs саагсагасс atat 34

<210> 10  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ6, що використовується для мутагенезу

<400> 10  
tagaaaaaac ttgtctgcc стаатгааас саааас 36

<210> 11  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ7, що використовується для мутагенезу

<400> 11  
aactttgtca агссттгсга аассаааст тас 33

<210> 12  
<211> 34  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ8, що використовується для мутагенезу

<400> 12  
gtcaagccta atgaatgcaa aacttacttt tgga 34

<210> 13  
<211> 35  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЕГ9, що використовується для мутагенезу

<400> 13  
caagcctaata gaaacctgca cttacttttg gaaag

35

<210> 14  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ10, що використовується для мутагенезу

<400> 14  
ctaatagaaac caaaacttgс ttgtgaaaag tgcaac

36

<210> 15  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ11, що використовується для мутагенезу

<400> 15  
atttcttatg aggaatgсca gaggcaagga gca

33

<210> 16  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ12, що використовується для мутагенезу

<400> 16  
tcttatgagg aagattgсag gcaaggagca gaa

33

<210> 17  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ13, що використовується для мутагенезу

<400> 17  
caaggagсag aaccttgсaa aaactttgtc aagcct

36

<210> 18  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ПЕГ14, що використовується для мутагенезу

<400> 18  
ggagсagaac ctatagсaa cttgtсaag cct

33

<210> 19

<211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ15, що використовується для мутагенезу

<400> 19  
 cgctcagttg csaagtgtca tcctaaaaact tgg 33

<210> 20  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ16, що використовується для мутагенезу

<400> 20  
 tcagttgcc aagaagtgtcc taaaacttgg gta 33

<210> 21  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ17, що використовується для мутагенезу

<400> 21  
 ctctcatct gctactgcga atctgtagat caa 33

<210> 22  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ18, що використовується для мутагенезу

<400> 22  
 caaaatcttt tccattctgc acctcagtcg tgtac 35

<210> 23  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ19, що використовується для мутагенезу

<400> 23  
 gtcaatgggt atgtatgcag gtctctgcc ggt 33

<210> 24  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер ПЕГ20, що використовується для мутагенезу

<400> 24  
cagacttatc gaggatgttc cactggaacc tta 33

<210> 25  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> праймер ПЕГ21, що використовується для мутагенезу

<400> 25  
atccaggctg aggtttgtga tacagtggtc att 33

<210> 26  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> праймер ПЕГ22, що використовується для мутагенезу

<400> 26  
gaagatgata aagtctgtcc tggtggaagc cat 33

<210> 27  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> праймер ПЕГ23, що використовується для мутагенезу

<400> 27  
cagcggattg gtaggtgtta caaaaaagtc cga 33

<210> 28  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> праймер ПЕГ24, що використовується для мутагенезу

<400> 28  
gaagatgggc caacttgctc agatcctcgg tgc 33

<210> 29  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

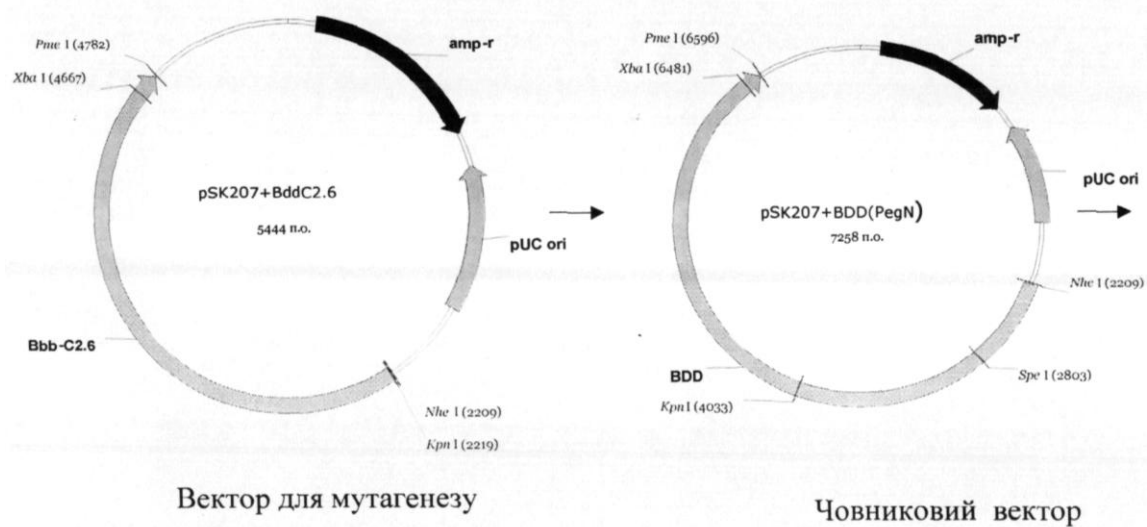
<220>  
<223> праймер ПЕГ25, що використовується для мутагенезу

<400> 29  
cagataatgt cagactgcag gaatgtcatc ctg 33

<210> 30

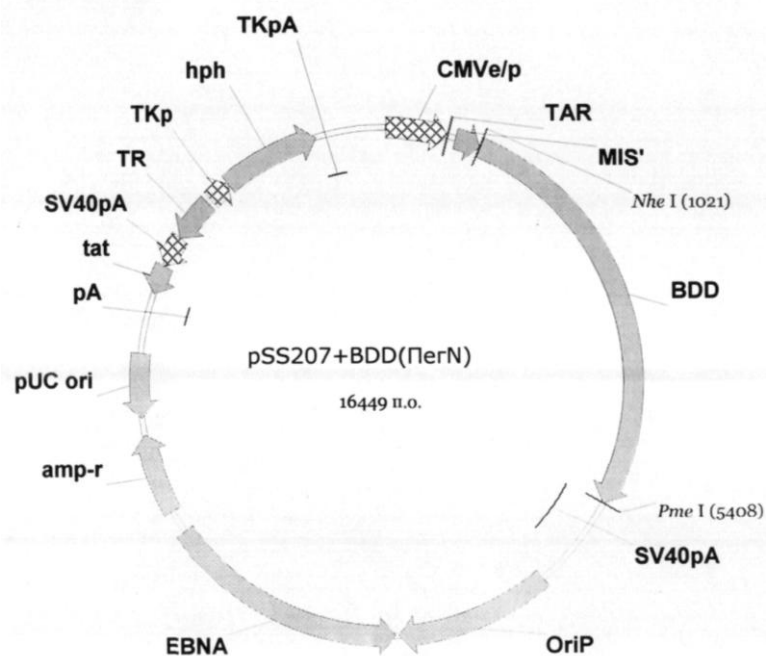
91	95225	92
<p>&lt;211&gt; 33          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Праймер ПЕГ26, що використовується для мутагенезу</p> <p>&lt;400&gt; 30          cacactaaca cactgtgtcc tgctcatggg aga</p>		33
<p>&lt;210&gt; 31          &lt;211&gt; 33          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Праймер ПЕГ27, що використовується для мутагенезу</p> <p>&lt;400&gt; 31          cagatggaag atccctgctt taaagagaat tat</p>		33
<p>&lt;210&gt; 32          &lt;211&gt; 33          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Праймер ПЕГ28, що використовується для мутагенезу</p> <p>&lt;400&gt; 32          acccagggtg cccgttgcaa gttctccagc ctc</p>		33
<p>&lt;210&gt; 33          &lt;211&gt; 33          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Праймер ПЕГ29, що використовується для мутагенезу</p> <p>&lt;400&gt; 33          aaagtaaagg ttttttgagg aaatcaagac tcc</p>		33
<p>&lt;210&gt; 34          &lt;211&gt; 33          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Праймер ПЕГ30, що використовується для мутагенезу</p> <p>&lt;400&gt; 34          ttgcagttgt cagttgcttt gcatgagggtg gca</p>		33
<p>&lt;210&gt; 35          &lt;211&gt; 33          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Праймер ПЕГ31, що використовується для мутагенезу</p> <p>&lt;400&gt; 35          aatatggaag gaaacgctag ggctccctgc aat</p>		33

# Мутагенез та субклонування BDD-ΠегN



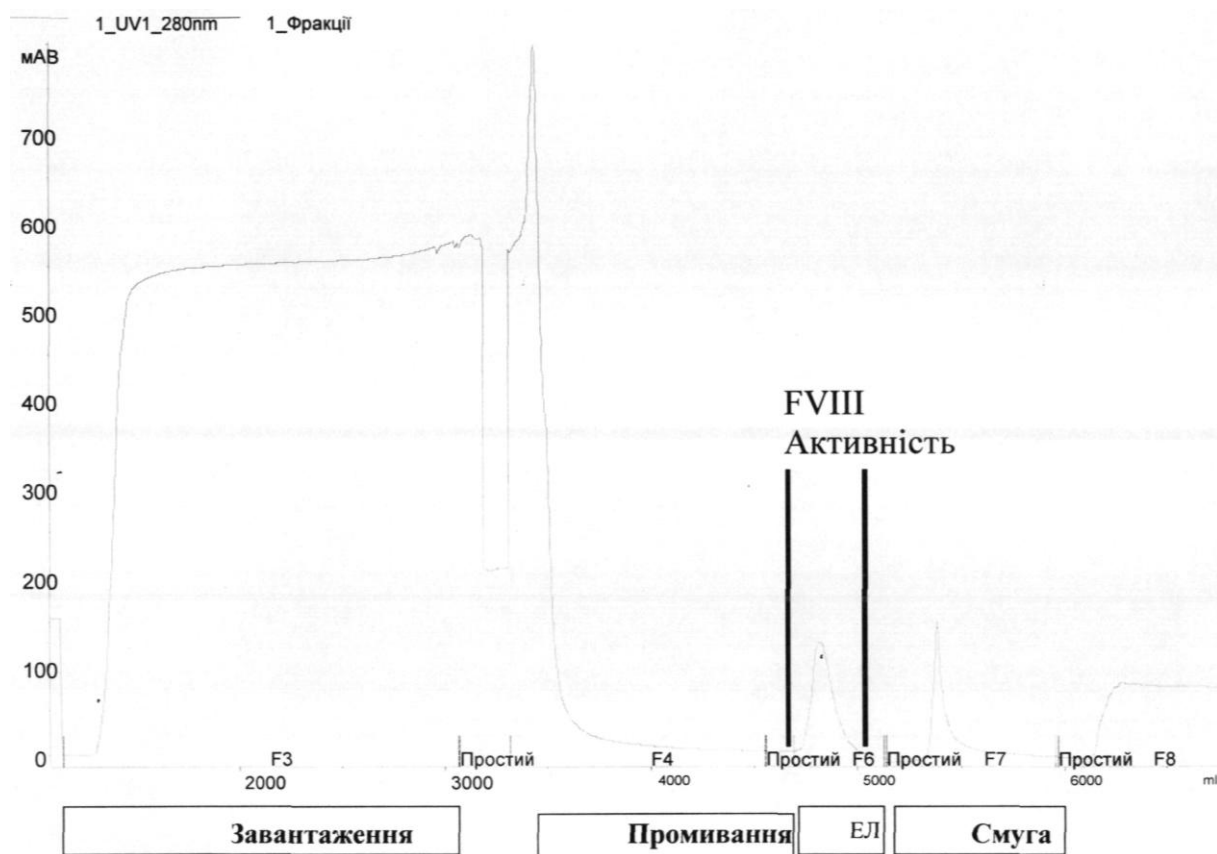
Фіг. 1а

# Мутагенез та субклонування BDD-ΠегN

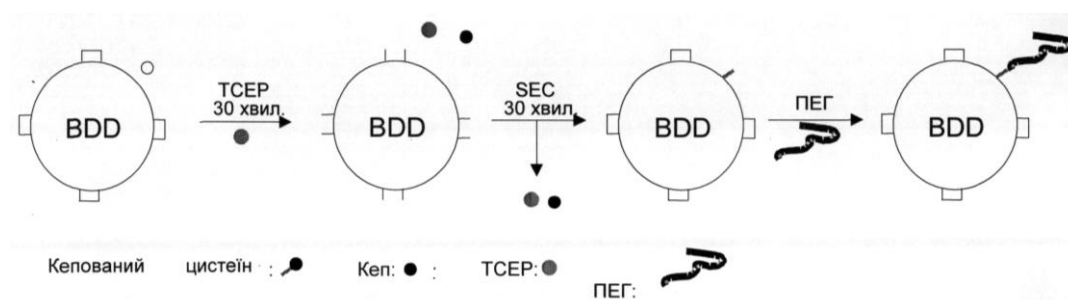


Вектор експресії

Фіг. 1б

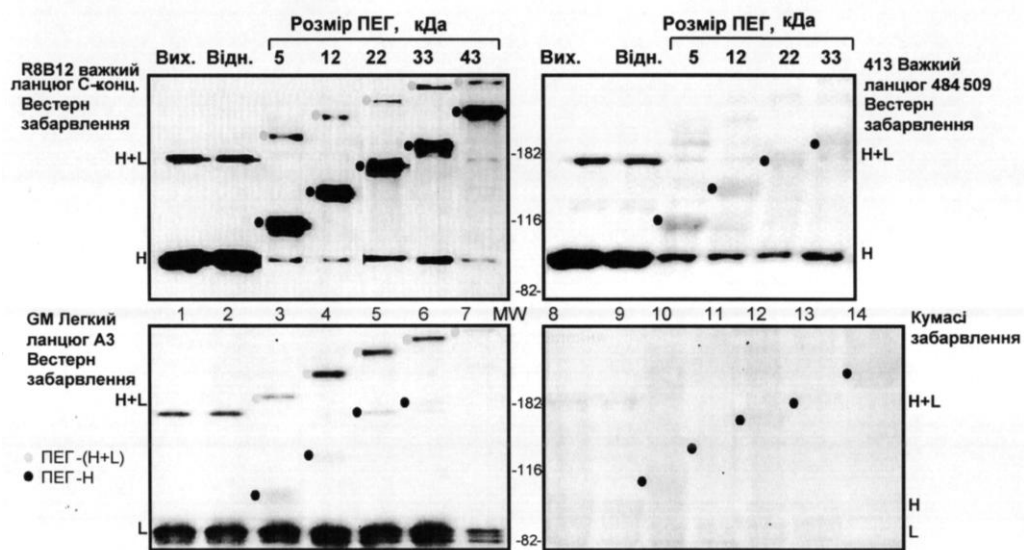


Фіг. 2

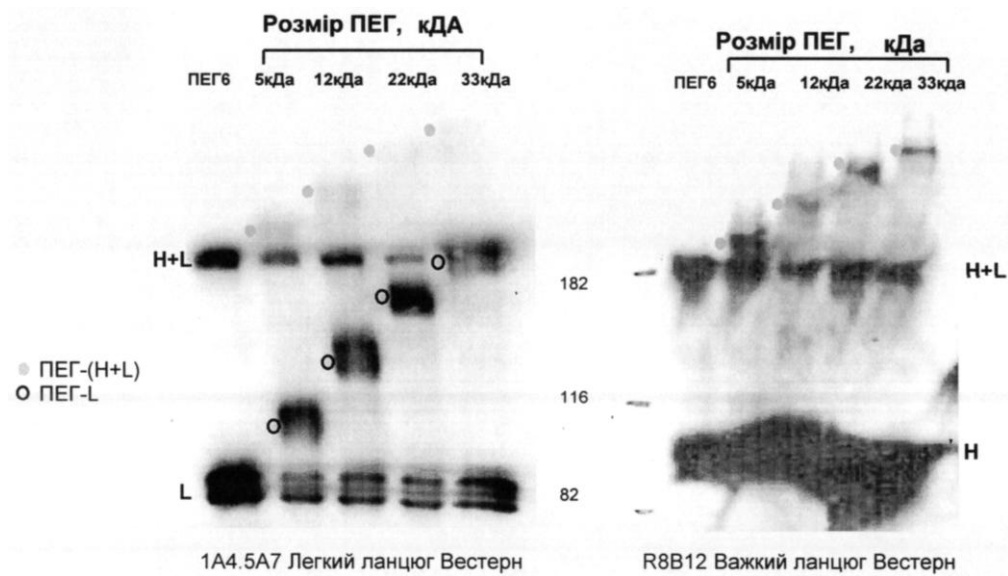


Фіг. 3

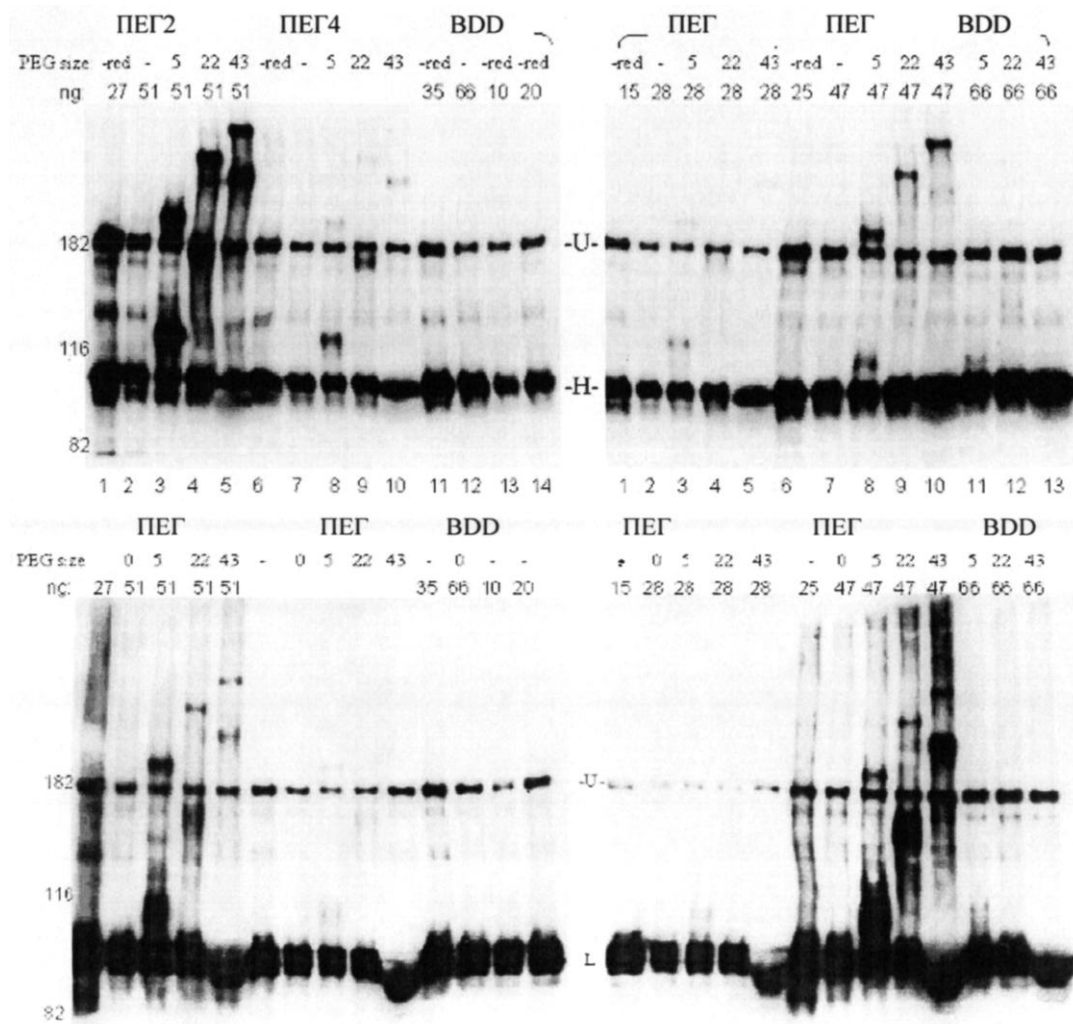




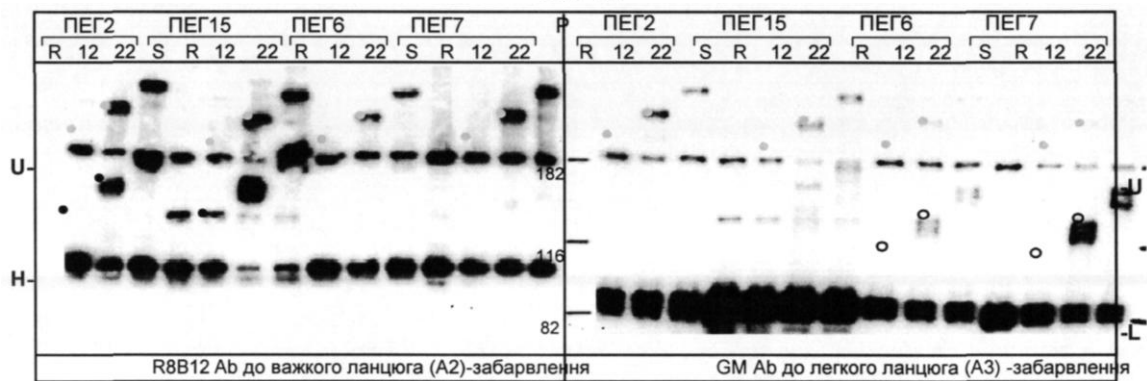
Фіг. 4



Фіг. 5

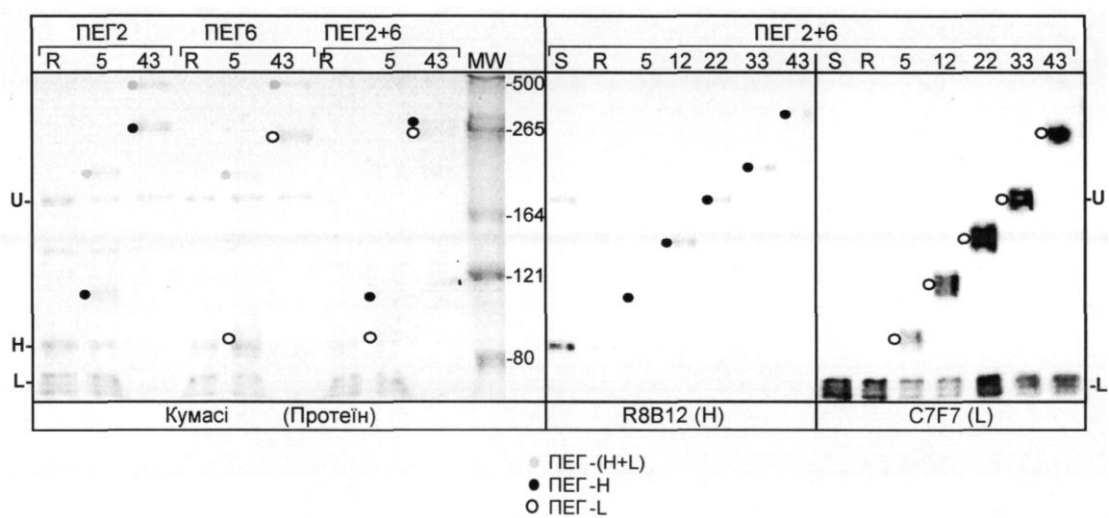


Фиг. 6а

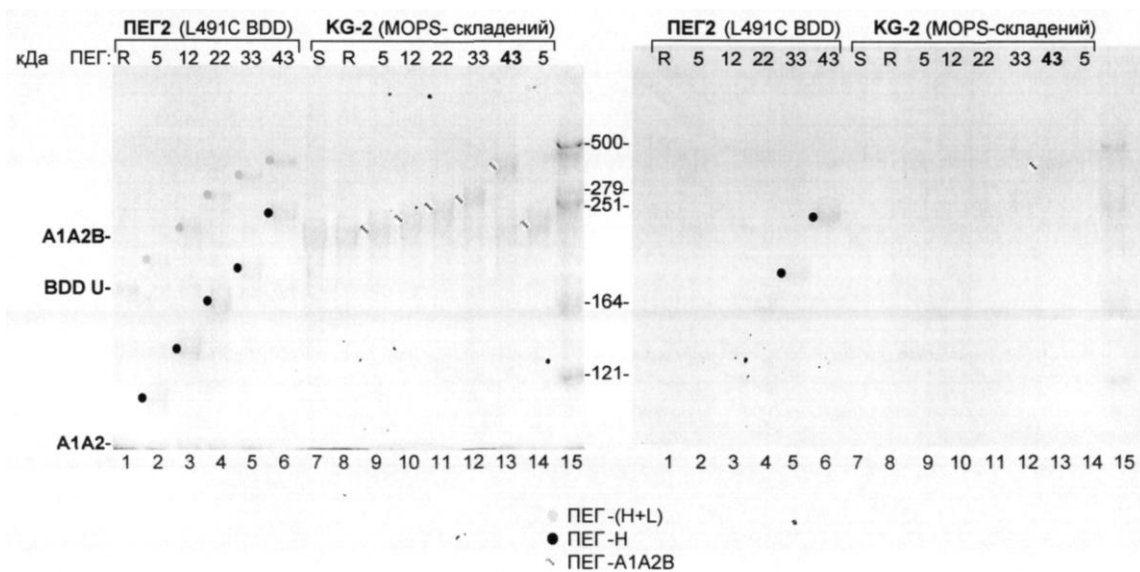


● ПЕГ-(H+L)  
 ● ПЕГ-H  
 ○ ПЕГ-L

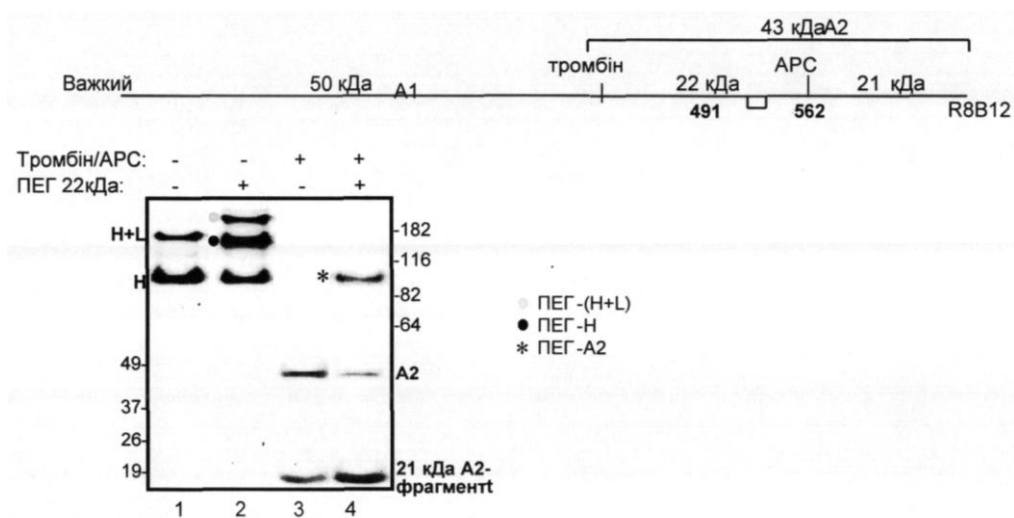
Фиг. 6б



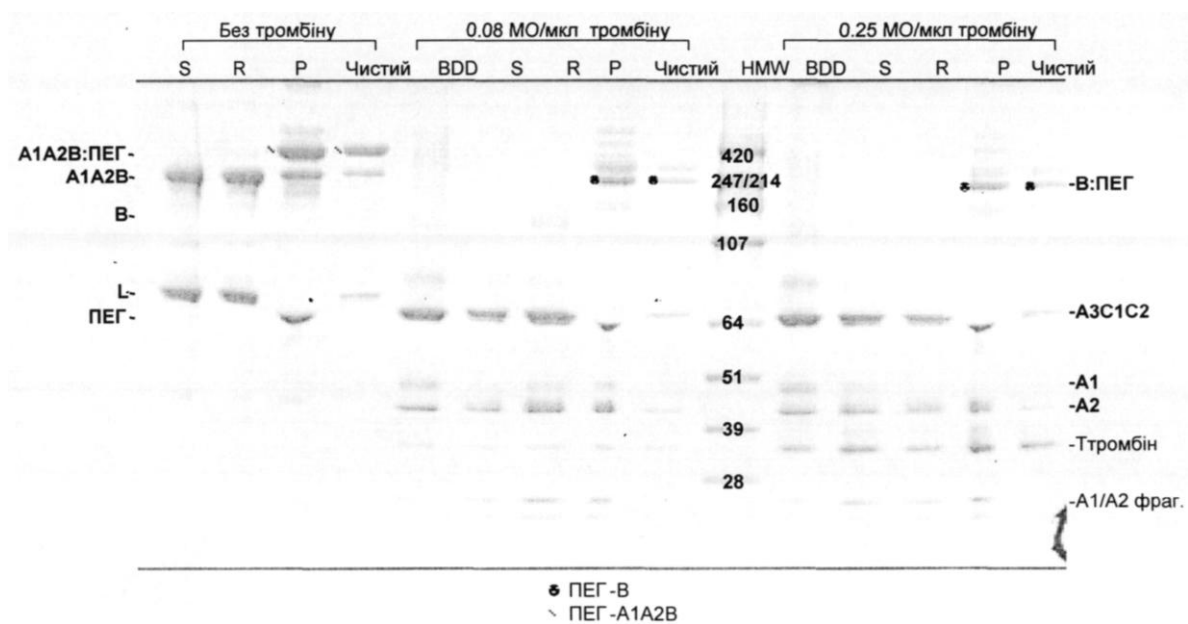
Фиг. 6с



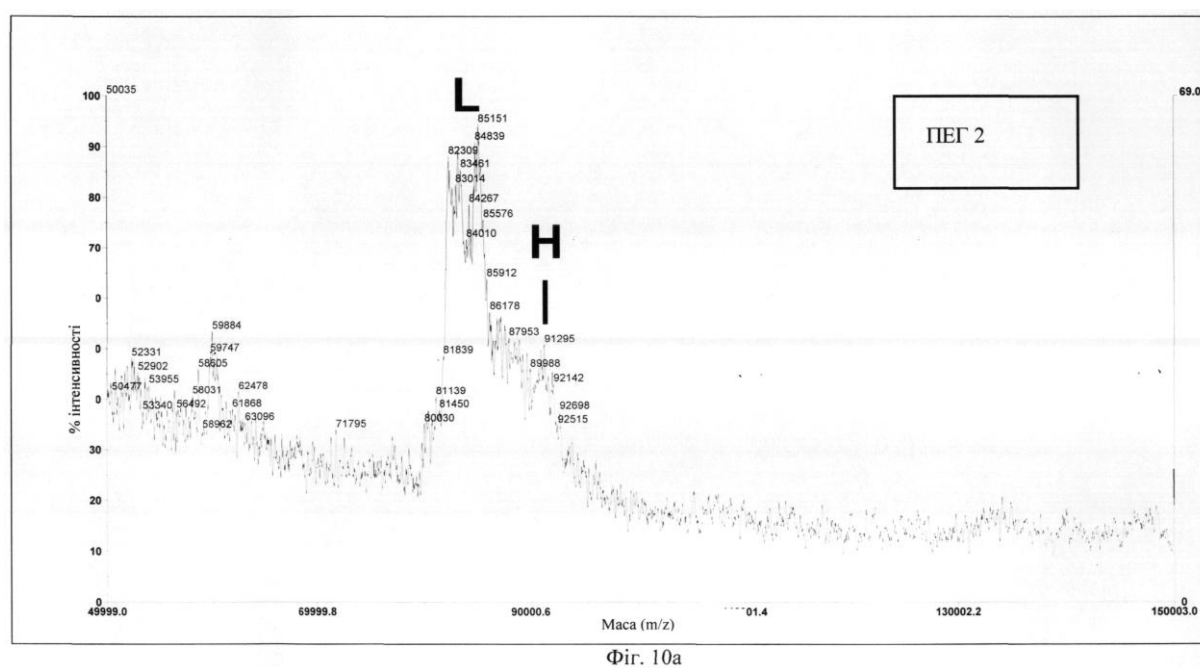
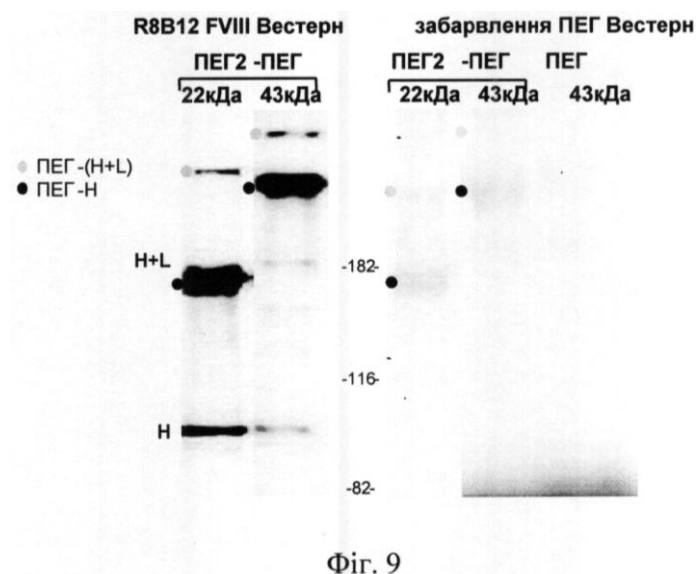
Фиг. 6d

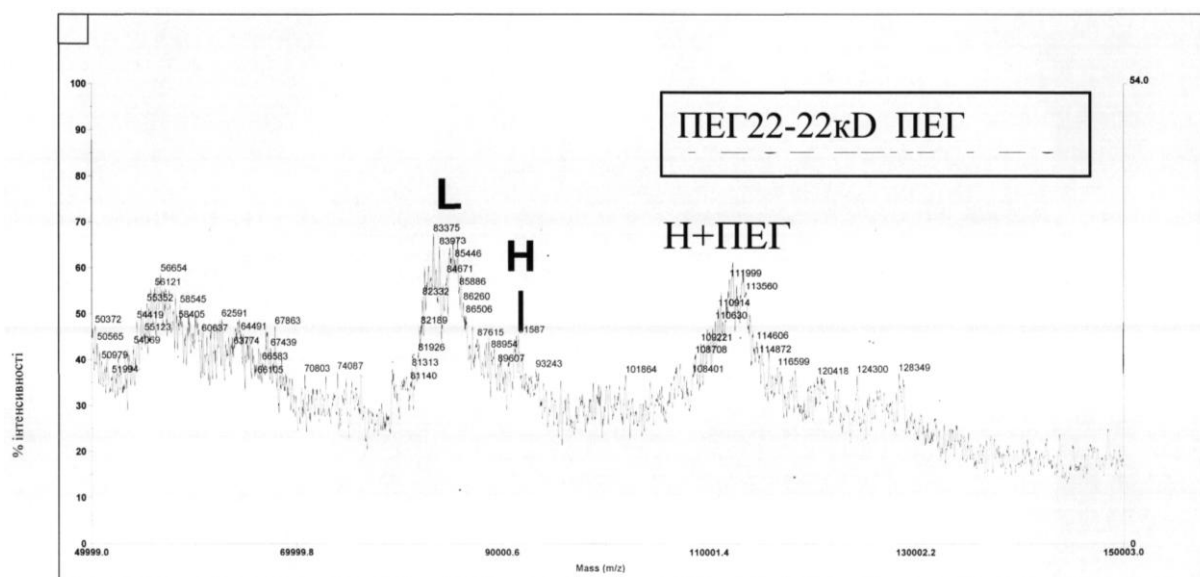


Фіг. 7

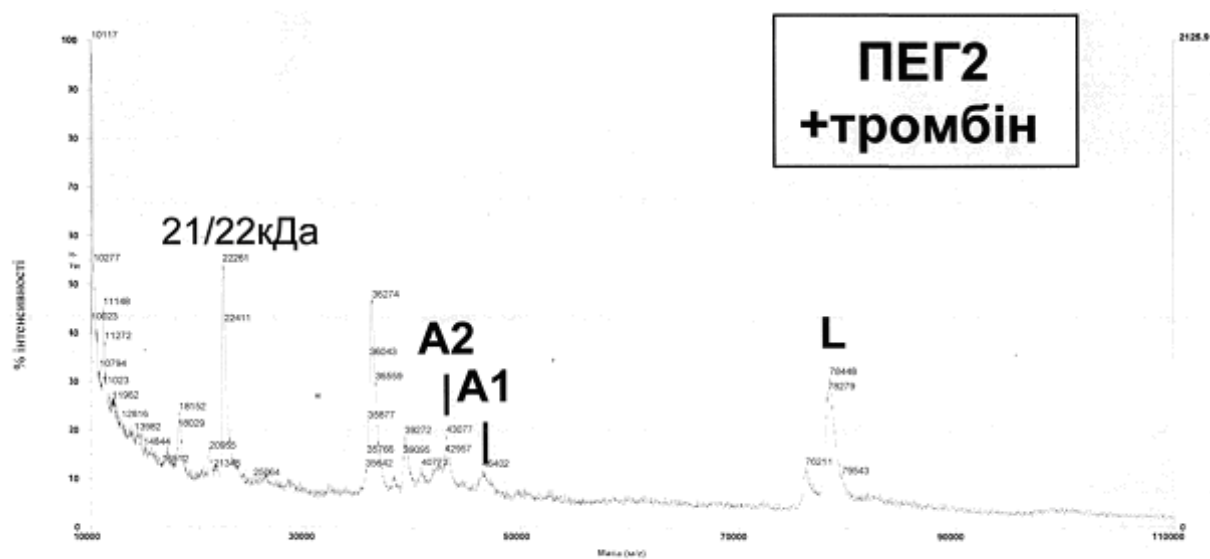


Фіг. 8





Фиг. 10b



Фиг. 11a

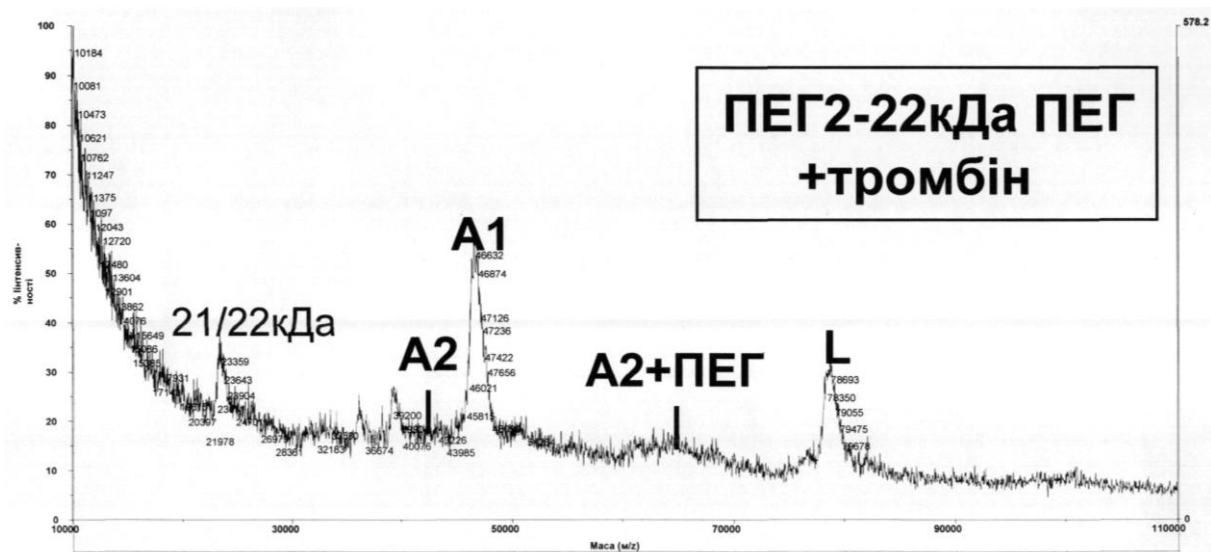
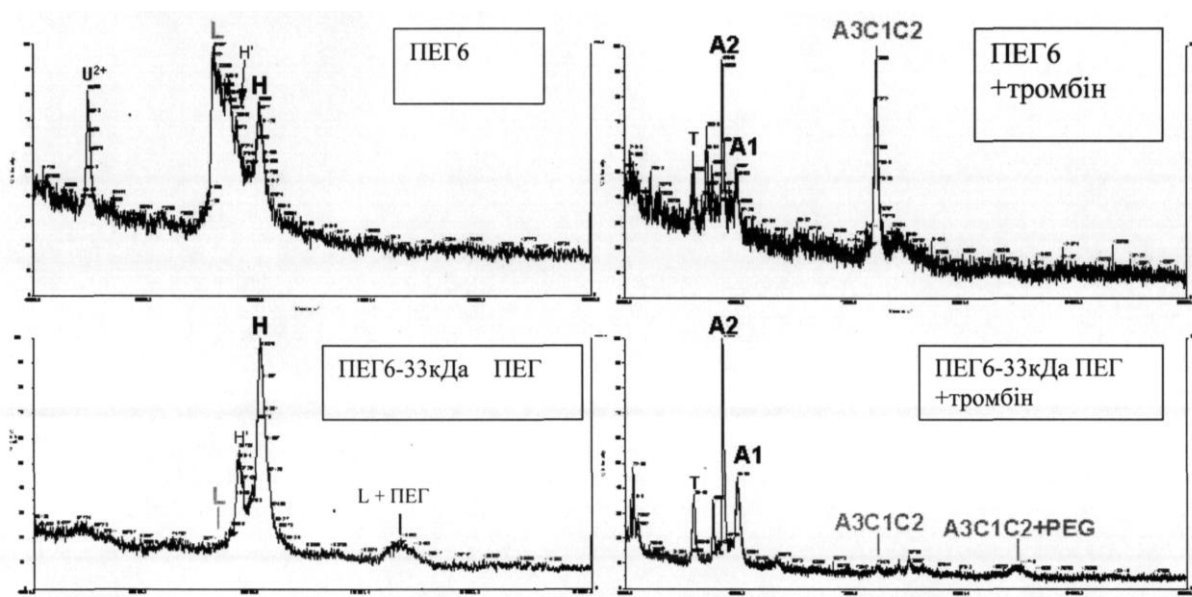
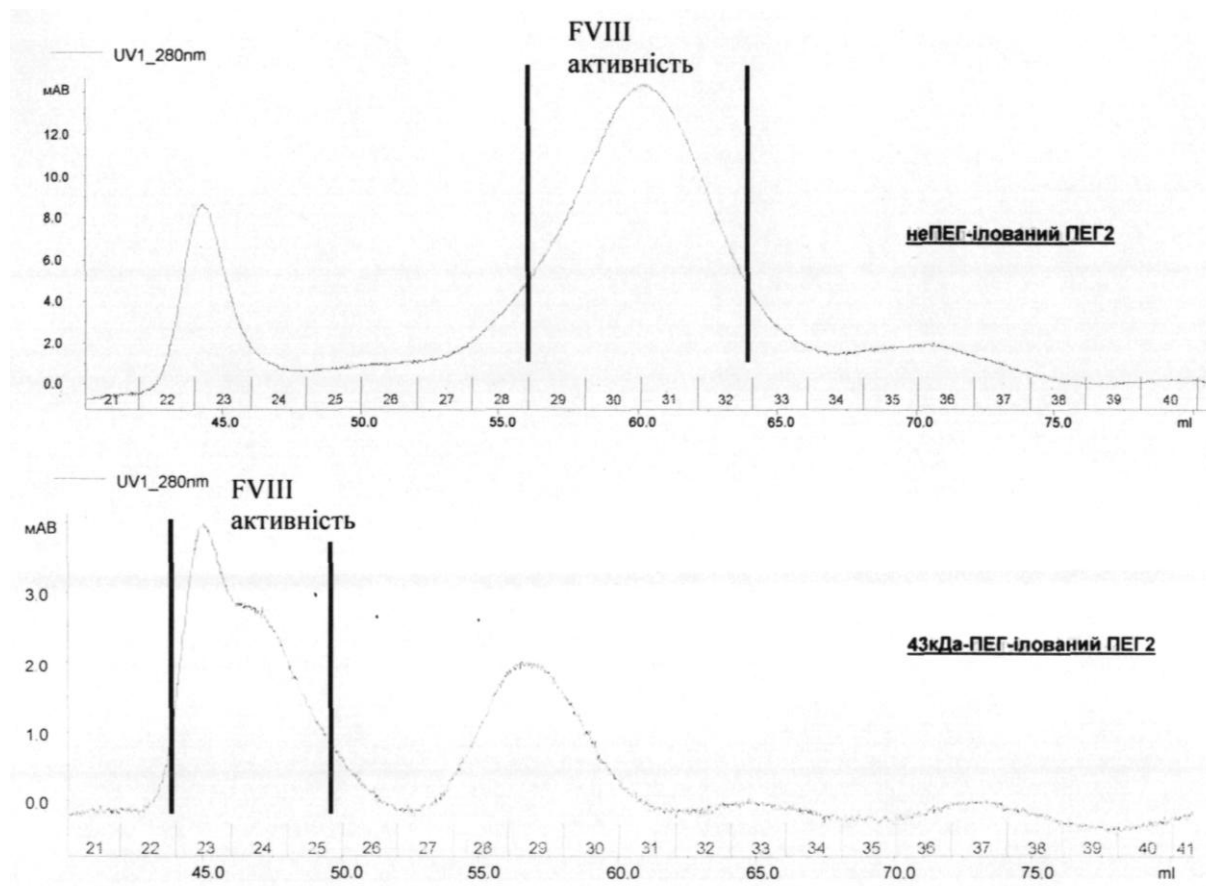


Fig. 11b



Селективне ПЕГ-илування в межах легкого ланцюга А3С1С2-доменів, підтверджене МАЛДІ-Мас-спектрометрією: Поряд з повним легким ланцюгом або А3С1С2-ПЕГ-илування; важкий ланцюг не виявляється, А1- або А2-ПЕГилування

Fig. 12



Фіг. 13



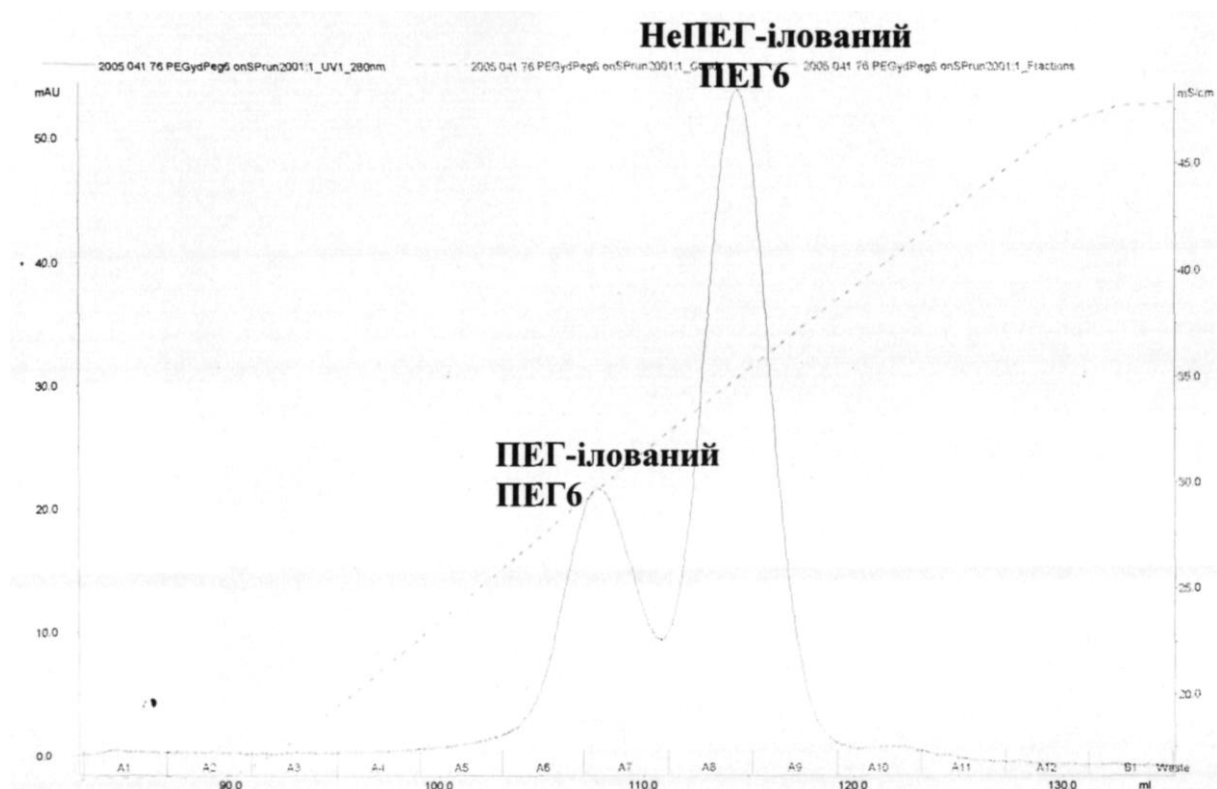


Fig. 14

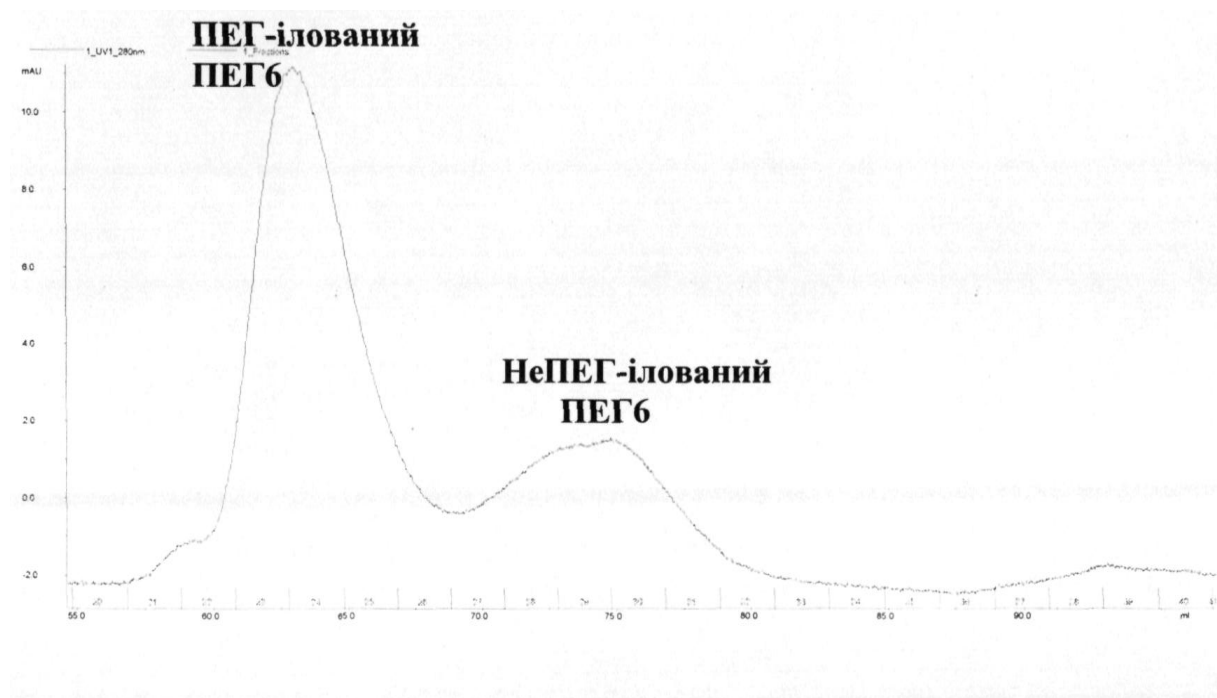
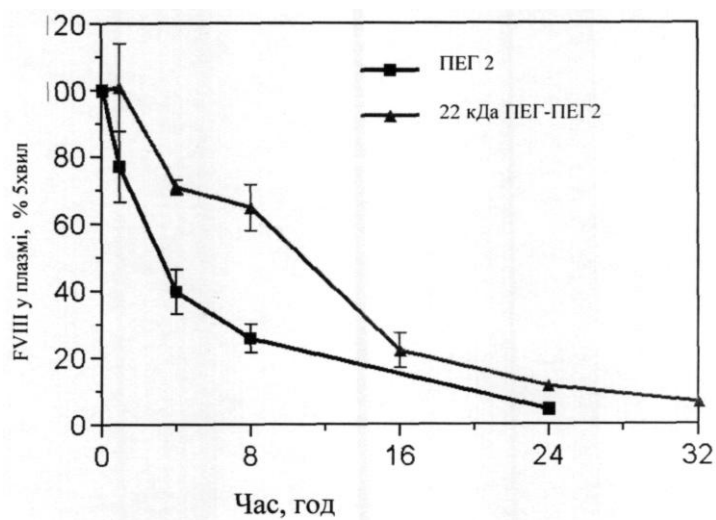
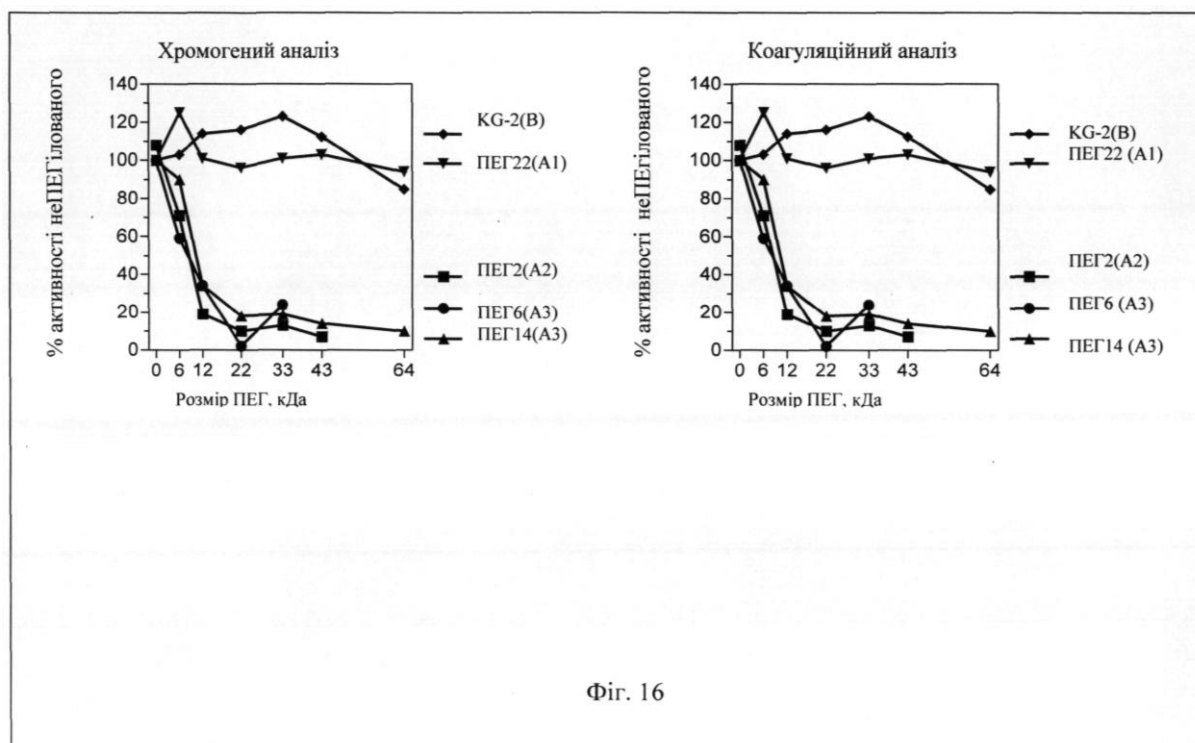
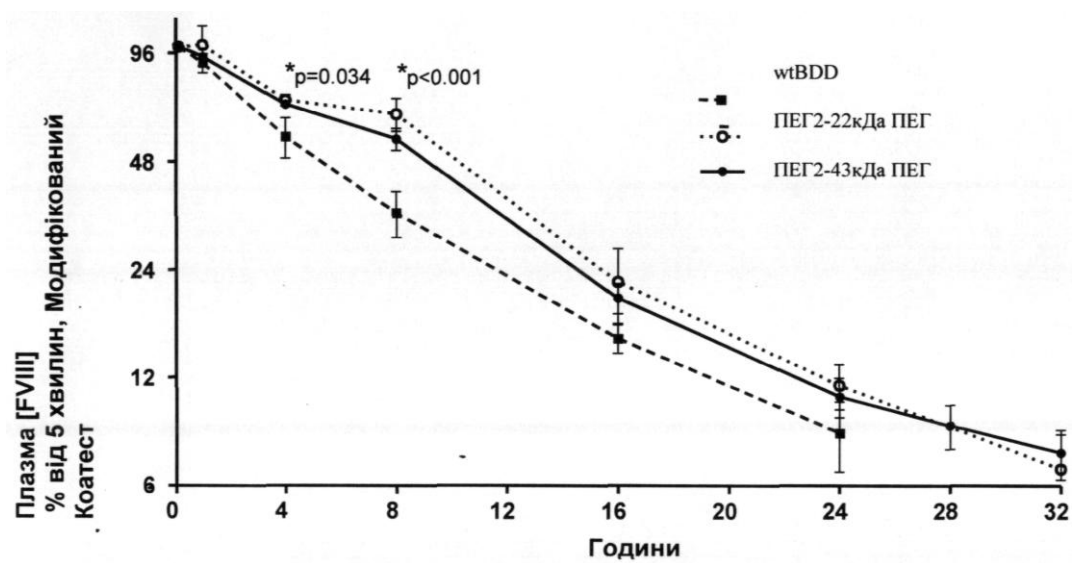
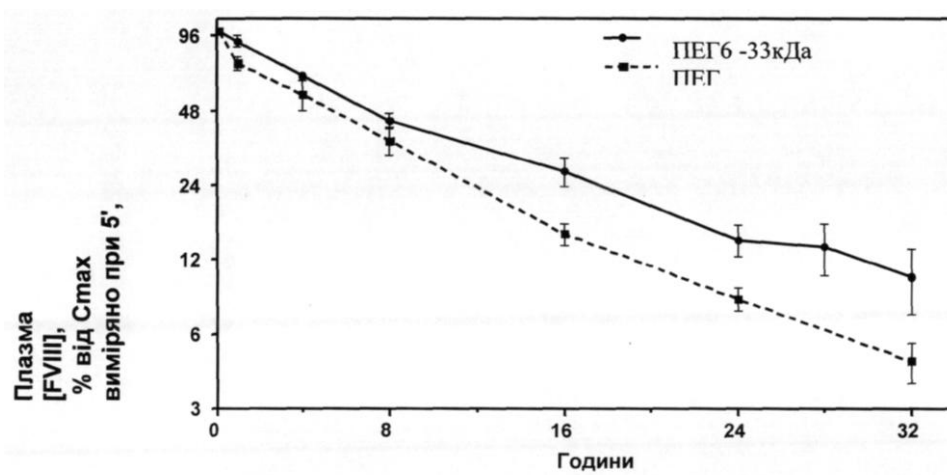


Fig. 15

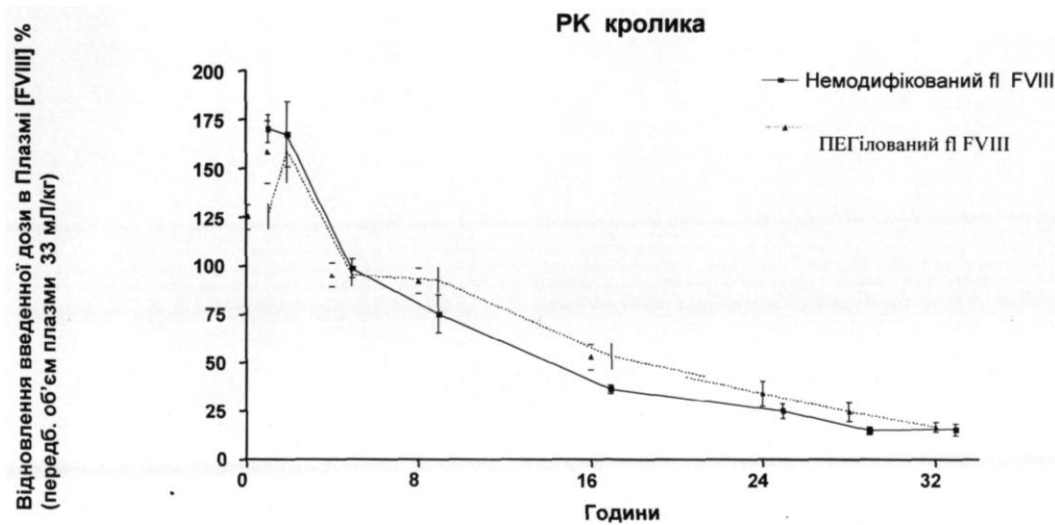




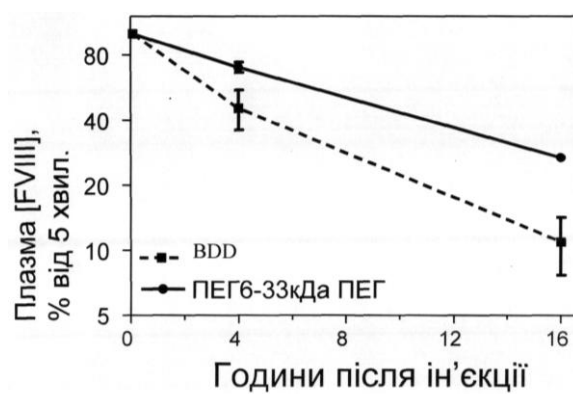
Фіг. 18



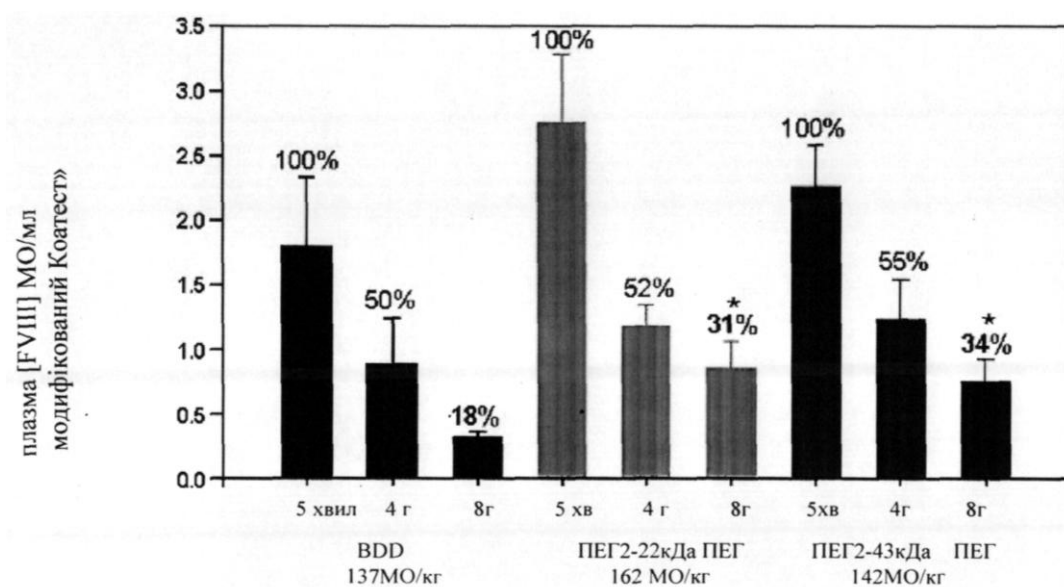
Фіг. 19



Фіг. 20

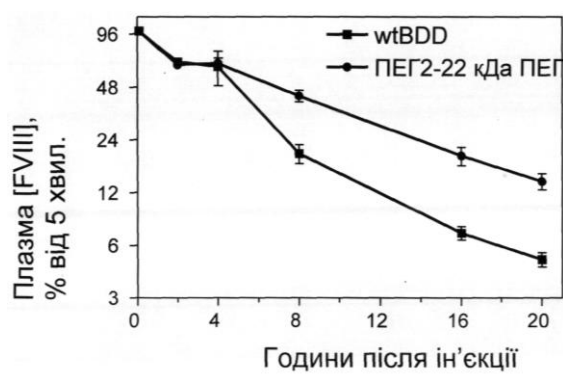


Фіг. 21

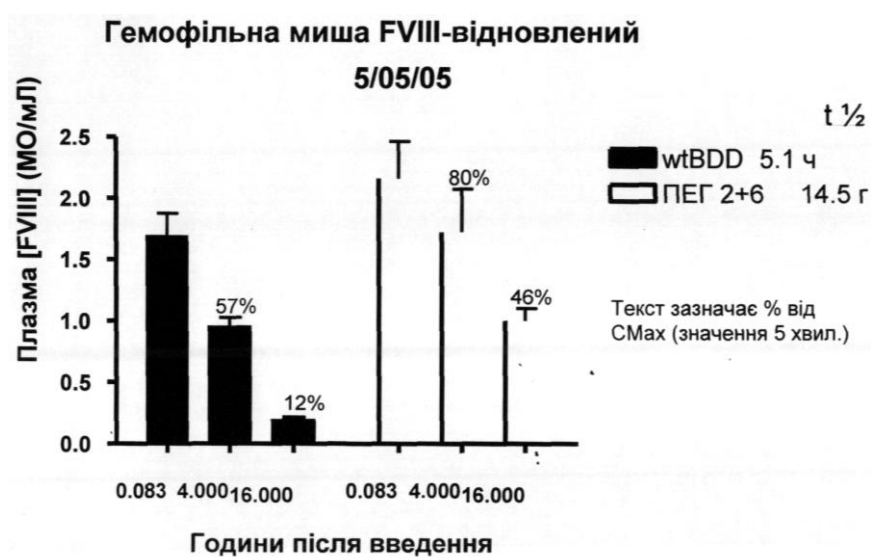


Кількість ПЕГілованого ПЕГ 2, виділеного з плазми, більша, ніж wtBDD,  $p=0/05$  при 8г.

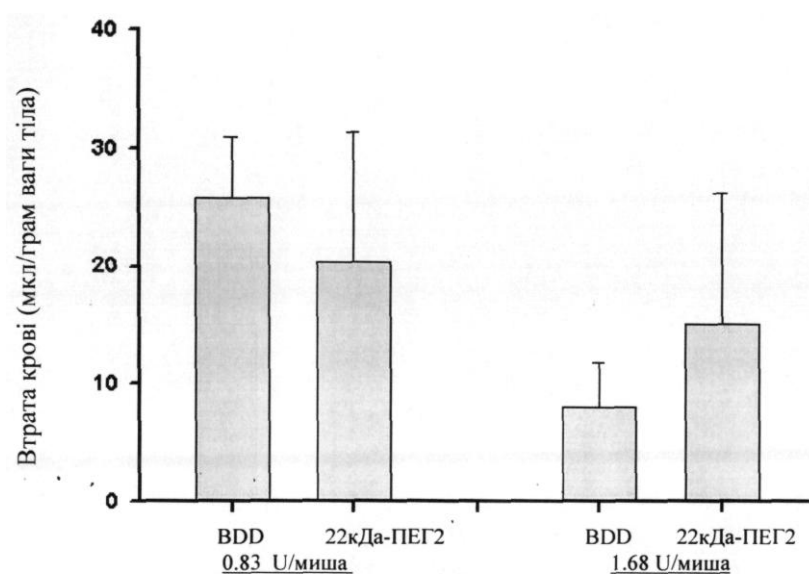
Фіг. 22.



Фіг. 23



Фіг. 24



Кожний стовпчик містить значення  $\pm$ SD, n=3-4 миші. Препарат вводили внутрішньовенно за 2 хвил. до пошкодження нирки

Фіг. 25.

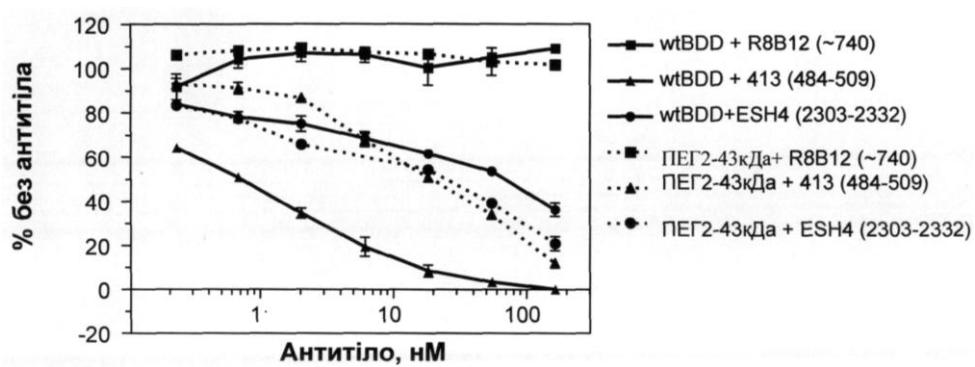


Fig. 26

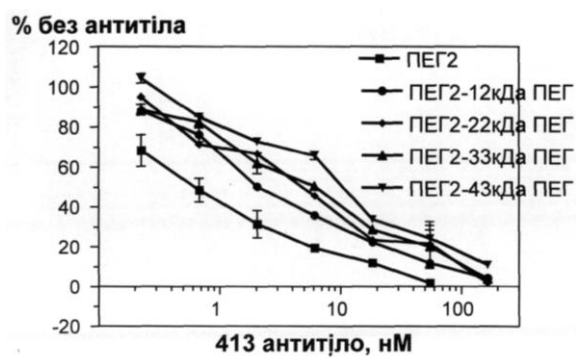


Fig. 27

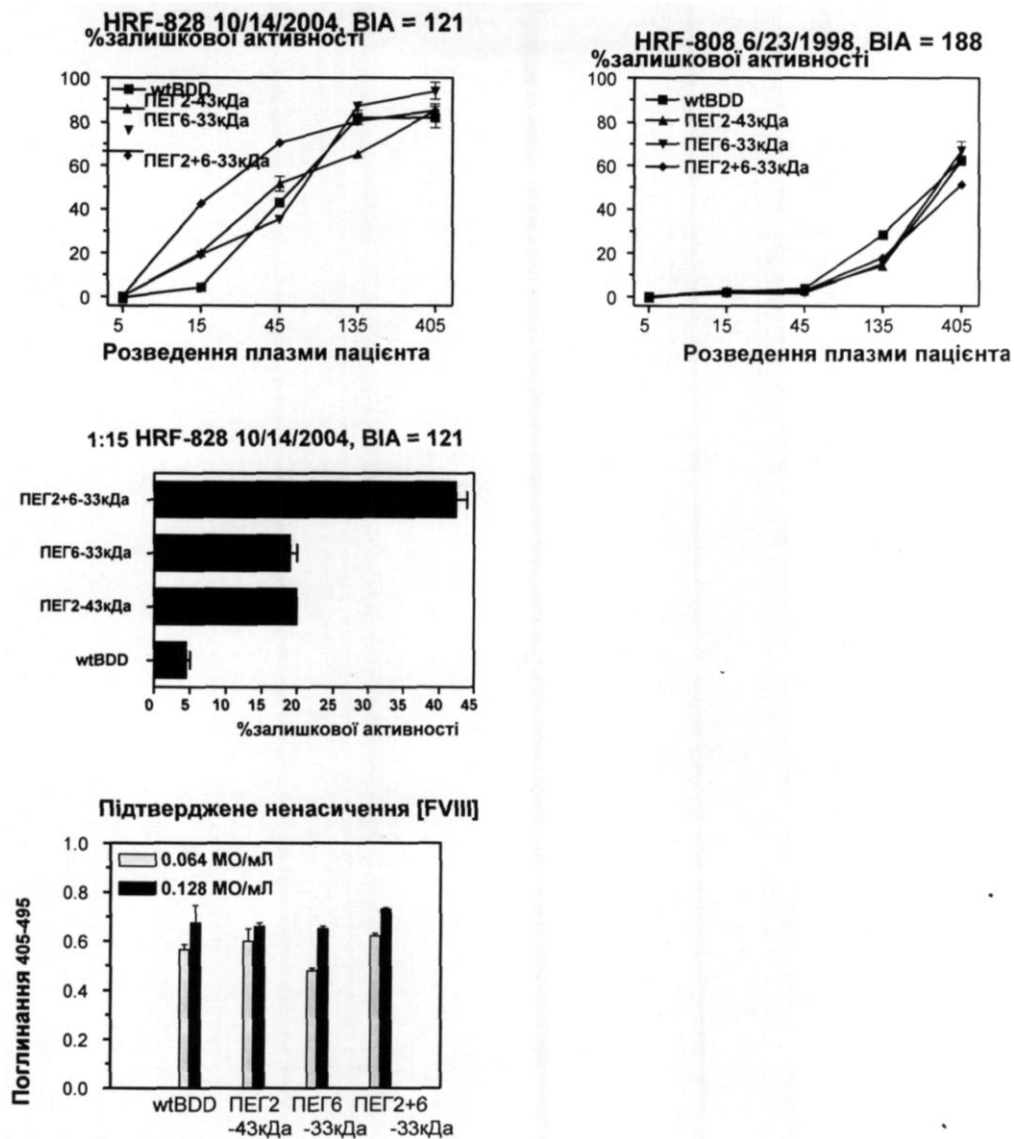
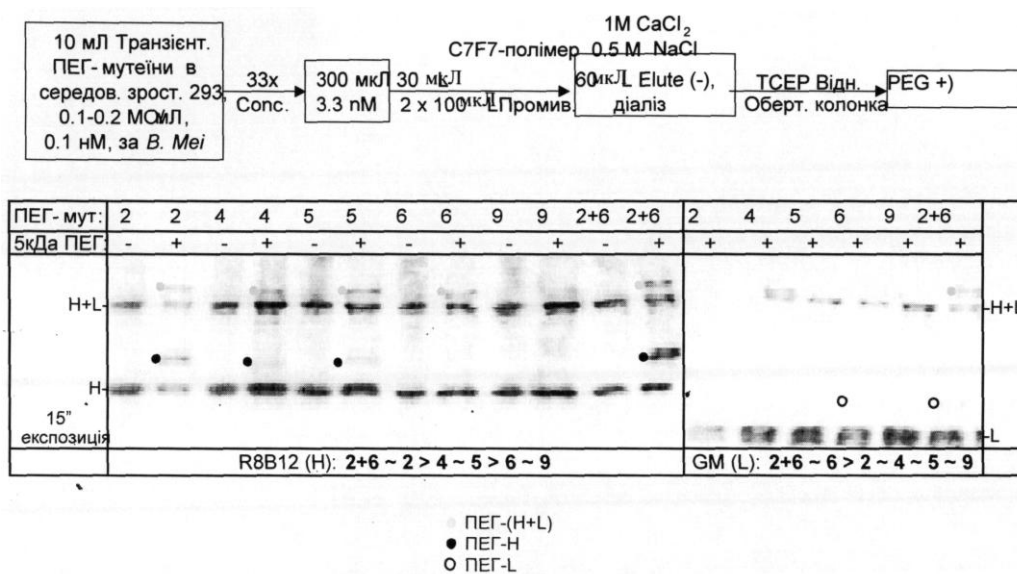
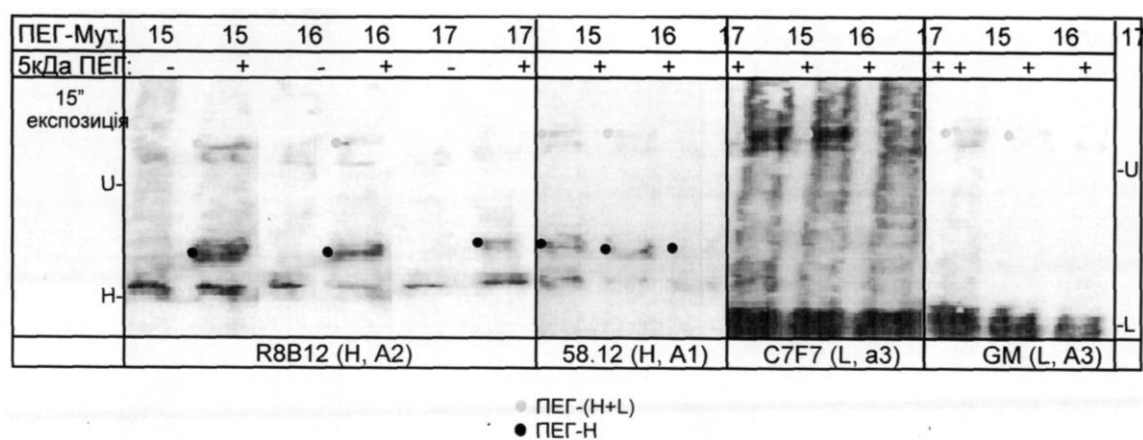


Fig. 28





Фіг. 29



Фіг. 30

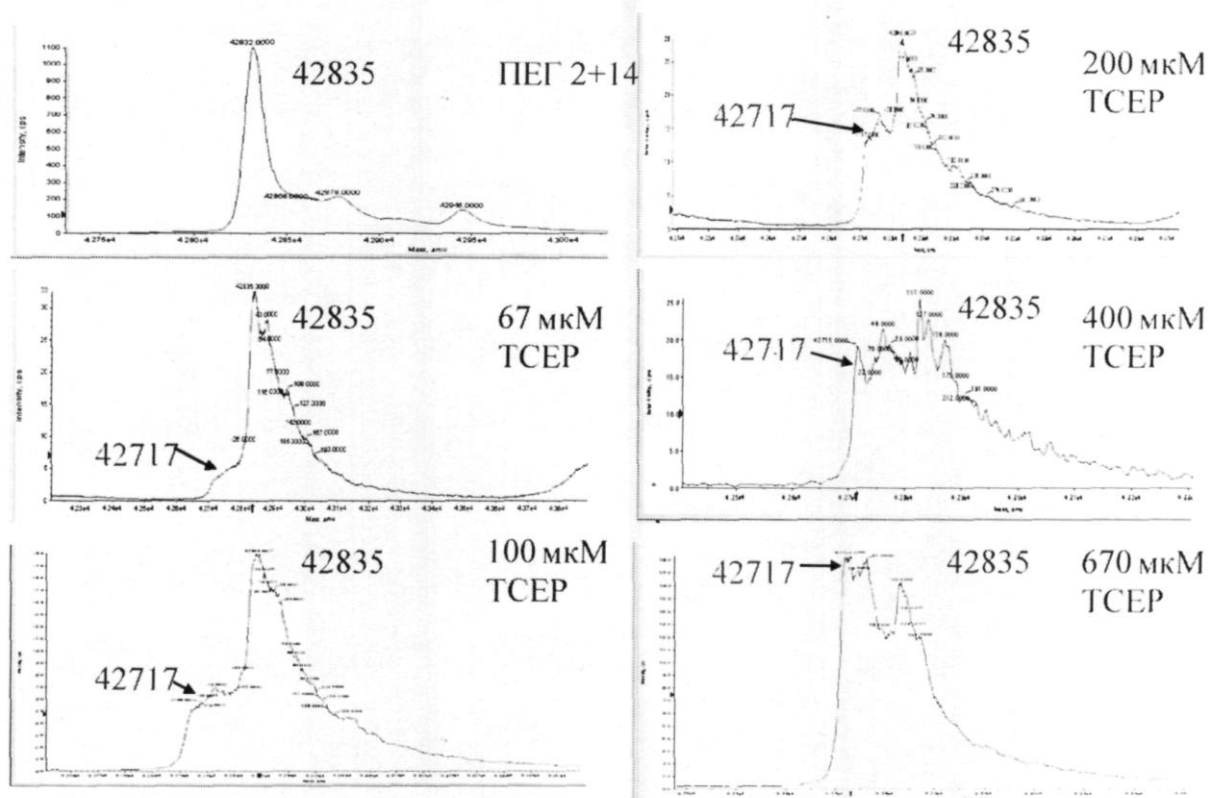
ТСЕР, мкМ: 67 100 200 400 670

● ПЕГ-Н  
○ ПЕГ-Л



Фиг. 31

Сумарне порівняння за фракцією А2 (43кДа)



Фиг. 32

