



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86744** (13) **C2**  
(51) МПК (2009)  
**A61K 38/36**  
**A61K 47/48**  
**A61P 7/02** (2006.01)  
**A61P 7/04** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПЕГІЛЬОВАНІ ГЛІКОФОРМИ ФАКТОРА VII

1

(21) 20041210113  
(22) 20.06.2003  
(24) 25.05.2009  
(86) РСТ/DK2003/000420, 20.06.2003  
(31) РА 2002 00964  
(32) 21.06.2002  
(33) DK  
(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.  
(72) КЛАУСЕН НІЛЬС КРИСТІАН, DK/DK, БЙОРН СЬОРЕН, DK/DK, БЕХРЕНС КАРСТЕН, DK/DK, ГАРІБЕЙ ПАТРИК ВІЛЬЯМ, US/DK  
(73) НОВО НОРДІСК ХЕЛС КЕА АГ  
(56) WO A 0158935 16.08.2001  
WO A 0229025 11.04.2002  
(57) 1. Кон'югат поліпептиду Фактора VII, що містить поліпептид Фактора VII з аспарагінзв'язаними та/або серинзв'язаними олігосахаридними ланцюгами, що включають сіаловокислотний компонент або галактозний компонент, причому принаймні одна олігосахаридна група є ковалентно зв'язаною з принаймні однією полімерною групою, вибраною з поліетиленгліколю з молекулярною масою в межах 300-100 000 дальтон.  
2. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за п. 1, який **відрізняється** тим, що полімерна група є приєднаною до сіаловокислотного компонента.  
3. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за п. 1 або п. 2, який **відрізняється** тим, що приблизно 94-100 % олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент.  
4. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за п. 3, який **відрізняється** тим, що приблизно 94-100 % олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент, і менше, ніж приблизно 25 % олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену.  
5. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за п. 4, який **відрізняється** тим, що менше, ніж приблизно 10 % олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену.  
6. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за п. 5, який **відрізняється** тим, що менше ніж приблизно 5, в оптимальному варіанті 2 % олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену.

2

7. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 4-6, який **відрізняється** тим, що приблизно 96-100 % олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент.  
8. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за п. 7, який **відрізняється** тим, що приблизно 98-100 % олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент.  
9. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що аспарагінзв'язані олігосахаридні ланцюги розташовуються у позиціях, які відповідають амінокислотним залишкам Asn-145 та Asn-322 людського FVIIa дикого типу (ФІГ. 1).  
10. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що серинзв'язані олігосахаридні ланцюги розташовуються у позиціях, які відповідають амінокислотним залишкам Ser-52 та Ser-60 людського FVIIa дикого типу (ФІГ. 1).  
11. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що поліпептид має амінокислотну послідовність людського Фактора VII дикого типу (ФІГ. 1).  
12. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що поліпептид є людським Фактором VIIa, що походить із плазми.  
13. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що поліпептиди Фактора VII вибирають із групи, яка складається з: S52A-Фактора VII, S60A-Фактора VII, Фактора VII, який було протеолітично розщеплено між залишками 290 та 291; Фактора VII, який було протеолітично розщеплено між залишками 315 та 316; Фактора VII, який було окиснено, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII;

(19) **UA** (11) **86744** (13) **C2**

варіантів послідовності Фактора VII, у яких амінокислотний залишок у позиціях 290 та/або 291, в оптимальному варіанті 290, було замінено, та варіантів послідовності Фактора VII, у яких амінокислотний залишок у позиціях 315 та/або 316, в оптимальному варіанті 315, було замінено.

14. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що поліпептиди Фактора VII вибирають із групи, яка складається з: L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,

K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,

16. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що пов'язаний з Фактором VII поліпептид виявляє принаймні приблизно 25 %, краще принаймні приблизно 50 %, ще краще принаймні приблизно 75 %, і найкраще принаймні приблизно 90 % специфічної активності Фактора VIIa дикого типу, який вироблявся в тому самому типі клітин, при випробуванні в одному або кількох аналізах коагуляції, аналізі протеолізу або аналізі TF-зв'язування, як описано у представленому описі.
17. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що пов'язаний з Фактором VII поліпептид виявляє менше, ніж приблизно 25 %, краще менше ніж приблизно 10 %, ще краще менше ніж приблизно 5 %, і найкраще менше ніж приблизно 1 % специфічної активності Фактора VIIa дикого типу, який вироблявся в тому самому типі клітин, при випробуванні в одному або кількох аналізах коагуляції, аналізі протеолізу або аналізі TF-зв'язування, як описано у представленому описі.
18. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що він має біодоступність, яка становить принаймні приблизно 110 % біодоступності контрольного кон'югата, наприклад, принаймні приблизно 120 %, приблизно 130 % або принаймні приблизно 140 % біодоступності контрольного кон'югата.
19. Кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що він має півперіод у сироватці, який становить принаймні приблизно 125 % півперіоду контрольного кон'югата, наприклад, приблизно 150 %, приблизно 200 % або принаймні приблизно 250 % півперіоду контрольного кон'югата.
20. Спосіб одержання кон'югата поліпептиду Фактора VII за пп. 1-19, який включає контактування поліпептидів Фактора VII з аспарагінзв'язаними та/або серинзв'язаними олігосахаридними ланцюгами, що включають сіаловокислотний компонент або галактозний компонент, причому принаймні одна олігосахаридна група є ковалентно зв'язаною з принаймні однією полімерною групою, вибраною з поліетиленгліколю з молекулярною масою в межах 300-100 000 дальтон.
21. Фармацевтична композиція, яка включає кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пунктів 1-19 та фармацевтично прийнятний носій або ад'ювант.
22. Спосіб лікування чутливого до Фактора VII синдрому, де спосіб включає введення фармацевтичної композиції, яку визначено у п. 21, пацієнтові, який потребує такого лікування, за умов, які в результаті забезпечують зниження кровотечі та/або збільшення коагуляції крові, причому композиція включає поліпептиди Фактора VII.
23. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що синдром належить до групи, яка складається з гемофілії А, гемофілії В, дефіциту Фактора XI, дефіциту Фактора VII, тромбоцитопенії, хвороби фон Віллебранда, присутності інгібітора коагулюючого фактора, хірургічної операції, травми та антикоагулянтної терапії, включаючи ділюційну коагуляцію, крововилив у мозок, трансплантацію стов-

бурих клітин, кровотечу з верхніх відділів шлунково-кишкового тракту та хвороби печінки.

24. Застосування композиції, яка включає кон'югат поліпептиду Фактора VII за будь-яким з пп. 1-19

Даний винахід стосується композицій, які включають кон'югати Фактора VII, які мають заданий характер глікозилювання.

Фактор VII є вітамін К-залежним білком плазми, який синтезується у печінці й секретується у кров як одноклановий глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 50 кДа. Зимоген FVII перетворюється на активовану форму (FVIIa) шляхом протеолітичного розщеплення. FVIIa у комплексі з тканинним фактором (TF) може перетворювати і Фактор IX, і Фактор X на їх активовані форми, з наступними реакціями, які ведуть до швидкого вироблення тромбіну та утворення фібрину.

Білки, які беруть участь у каскаді коагуляції, включаючи, наприклад, Фактор VII, Фактор VIII, Фактор IX, Фактор X та Протеїн C, виявили себе корисними терапевтичними засобами для лікування різних патологічних станів. Відповідним чином, існує зростаюча потреба в композиціях, які включають ці білки, які є фармацевтично прийнятними і виявляють рівномірну й заздалегідь задану клінічну ефективність.

Через багато недоліків застосування людської плазми як джерела фармацевтичних продуктів перевагу віддають виробленню цих білків у рекомбінантних системах. Однак, коагулюючі білки піддаються різним ко- та посттрансляційним модифікаціям, включаючи, наприклад, аспарагін-зв'язане (N-зв'язане) глікозилювання; O-зв'язане глікозилювання; та γ-карбоксілювання glu- залишків. Ці модифікації можуть бути якісно або кількісно відмінними, коли застосовують гетерологічні клітини як хазяї для великомасштабного виробництва білків. Зокрема, вироблення у гетерологічних клітинах часто призводить до іншої групи глікоформ, які є ідентичними поліпептидами, що мають різні ковалентно зв'язані олігосахаридні структури.

У різних системах зміни у структурі олігосахаридів терапевтичних білків пов'язується, крім іншого, зі змінами в імуногенності та in vivo кліренсі.

Крім in vivo кліренсу, функціональний in vivo півперіод також має значення для періоду часу, протягом якого сполука є "терапевтично доступною" в організмі.

Півперіод rFVIIa у системі кровообігу становить приблизно 2,3 години ("Summary Basis for Approval for NovoSeven®", реєстраційний номер FDA 96-0597).

Композиції людського рекомбінантного FVIIa серійного виробництва реалізуються на ринку як NovoSeven®. NovoSeven® є єдиним присутнім на ринку rFVIIa для ефективного й надійного лікування відпадів кровотечі. Необхідні відносно високі дози та часте введення для досягнення та підтримання потрібного терапевтичного та профілактичного ефекту. Внаслідок цього регуляція належної дози ускладнюється, і потреба у частих внутріш-

для виготовлення медикаменту для лікування чутливого до Фактора VII синдрому.

ньовених введеннях накладає обмеження на спосіб життя пацієнта.

Молекула з довшим півперіодом у системі кровообігу знижує кількість необхідних введень. Якщо враховувати те, що нині існуючий продукт FVIIa є пов'язаним з частими ін'єкціями, стає зрозумілою потреба у поліпшених молекулах FVII.

Одним зі шляхів поліпшення циркуляції є забезпечення зменшення швидкості виведення з організму. Як уже було сказано, зміни у структурі олігосахаридів терапевтичних білків є пов'язаними, крім іншого, з in vivo кліренсом. Крім того, приєднання хімічного компонента до поліпептиду може знизити нирковий кліренс поліпептиду.

Повідомлялося про неактивні форми FVII. Інактивована форма здатна конкурувати з FVII або FVIIa дикого типу у зв'язуванні з тканинним фактором та інгібуванням коагулюючої активності. Пропонувалося застосовувати інактивовану форму FVIIa для лікування пацієнтів, які перебувають у стані, схильному до гіперкоагуляції, таких як пацієнти з сепсисом, піддані ризикові інфаркту міокарда або тромботичного удару.

У WO 98/32466 вказується, що FVII, серед багатьох інших білків, може бути ПЕГільованим, але не містить ніякої іншої інформації в цьому відношенні.

У WO 01/58935 заявлено кон'югати неоліпептидних компонентів (наприклад, ПЕГ) з поліпептидом, у яких амінокислотна послідовність відрізняється від послідовності FVII дикого типу тим, що принаймні один амінокислотний залишок, який включає з'єднувальну групу для неоліпептидного компонента є включеним або видаленим.

У US 4847325 вказано, що колонієстимулюючий фактор-1 (CSF-1) може бути приєднаний до ПЕГ шляхом реакції похідних ПЕГ з окисненим CSF-1.

Таким чином, у галузі існує потреба в композиціях та способах, які забезпечують композиції коагулюючого білка, зокрема, композиції, які включають поліпшений рекомбінантний людський Фактор VII, модифікований Фактор VII або пов'язаний з Фактором VII поліпептид.

Авторами було виявлено, що композиції поліпептидів Фактора VII, які мають структури глікоформи, які містять принаймні одну олігосахаридну групу, ковалентно зв'язану з принаймні однією полімерною групою, мають поліпшені функціональні властивості. Відповідним чином, даний винахід стосується способів та композицій, які забезпечують ці композиції кон'югованих білків.

Відповідним чином, даний винахід у першому аспекті стосується композиції, яка включає певну кількість поліпептидів Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, у яких поліпептиди включають аспарагін-зв'язані та/або серин-зв'язані

олігосахаридні ланцюги, і принаймні одна олігосахаридна група є ковалентно зв'язаною з принаймні однією полімерною групою.

В одному варіанті втілення полімерна група є ковалентно зв'язаною з сіаловокислотним компонентом. В іншому варіанті втілення полімерна група є ковалентно зв'язаною з галактозним компонентом.

В одному варіанті втілення приблизно 94-100% олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент.

В одному варіанті втілення приблизно 94-100% олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент, і менше, ніж приблизно 25% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену.

В одному варіанті втілення менше, ніж приблизно 10% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену.

В одному варіанті втілення менше, ніж приблизно 5, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 2% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену.

В одному варіанті втілення приблизно 96-100% олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент.

В одному варіанті втілення приблизно 98-100% олігосахаридних ланцюгів включають принаймні один сіаловокислотний компонент.

В одному варіанті втілення аспарагін-зв'язані олігосахаридні ланцюги розташовуються в позиціях, які відповідають амінокислотним залишкам Asn-145 та Asn-322 людського FVIIa дикого типу (Фіг.).

В одному варіанті втілення серин-зв'язані олігосахаридні ланцюги розташовуються в позиціях, які відповідають амінокислотним залишкам Ser-52 та Ser-60 людського FVIIa дикого типу (Фіг.).

В одному варіанті втілення полімери вибирають із групи, яка включає: поліалкіленоксид (PAO), включаючи поліалкіленгліколь (PAG), такий як поліетиленгліколь (ПЕГ) та поліпропіленгліколь (PPG), розгалужені ПЕГ, полівініловий спирт (PVA), полікарбоксилат, полівінілпіролідон, поліетилен-ангідрид малеїнової кислоти, полістирол-ангідрид малеїнової кислоти та декстран, включаючи карбоксиметил-декстран, поліуретан, поліестер та поліамід.

В одному варіанті втілення полімером є поліетиленгліколь (ПЕГ); в одному варіанті втілення поліетиленгліколем є ПЕГ з молекулярною масою 300-100000Да, наприклад, приблизно 500-20000Да або приблизно 500-15000Да, або 2-15кДа, або 3-15кДа, або 3-12кДа, або приблизно 10кДа.

В одному варіанті втілення поліпептид має амінокислотну послідовність Фактора VII дикого типу (Фіг.). В одному варіанті втілення поліпептиди є Фактором VII дикого типу.

В одному варіанті втілення поліпептиди Фактора VII вибирають із групи, яка складається з: S52A-Фактора VII, S60A-Фактора VII, Фактора VII, який було протеолітично розщеплено між залишками 290 та 291; Фактора VII, який було протеолітично розщеплено між залишками 315 та 316; Фактор VII, який було окиснено, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVTI, L305I-FVII, L305T-FVII,

F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII; варіантів послідовності Фактора VII, у яких амінокислотний залишок у позиціях 290 та/або 291, в оптимальному варіанті - 290, було замінено; та варіантів послідовності Фактора VII, у яких амінокислотний залишок у позиціях 315 та/або 316, в оптимальному варіанті - 315, було замінено. В іншому варіанті втілення поліпептиди Фактора VII вибирають із переліку, який складається з: варіантів Фактора VII, які мають підвищену біологічну активність порівняно з FVIIa дикого типу, як описано у WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/77218, WO 03/27147 та WO 03/37932; L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V15817E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/FG37A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,

K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K16H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V58T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII,

F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII,  
F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII,  
F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII,  
F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII,  
F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII,  
F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,  
F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII,  
F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII,  
F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII,  
F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII,  
F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII,  
F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII,  
F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII,  
F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII,  
F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-  
FVII,  
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-  
FVII, 852A-Фактора VII, S60A-Фактора VII; та  
P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII,  
V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII,  
R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-  
FVII; FVII, що має заміщення, включення або де-  
леції в амінокислотній послідовності від 233Thr до  
240Asn, FVII, що має заміщення, включення або  
делеції в амінокислотній послідовності від 304Arg

до 329Cys, та FVII, що має заміщення, делеції, включення в амінокислотній послідовності Ile53-Arg223.

В одному варіанті втілення пов'язані з Фактором VII поліпептиди вибирають із групи, яка складається з: R152E-Фактора VII, 8344A-Фактора VII, FFR-Фактора VII та Фактора VIIa без Gla-домену.

В одному варіанті втілення пов'язаний з Фактором VII поліпептид виявляє принаймні приблизно 25%, в оптимальному варіанті - принаймні приблизно 50%, ще краще - принаймні приблизно 75%, і найкраще - принаймні приблизно 90% специфічної активності Фактора VIIa дикого типу, який вироблявся в тому самому типі клітин, при випробуванні в одному або кількох аналізах коагуляції, аналізі протеолізу або аналізі TF-зв'язування, як описано у представленому описі.

В одному варіанті втілення пов'язаний з Фактором VII поліпептид виявляє менше, ніж приблизно 25%, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 10%, ще краще - менше, ніж приблизно 5%, і найкраще - менше, ніж приблизно 1% специфічної активності Фактора VIIa дикого типу, який вироблявся в тому самому типі клітин, при випробуванні в одному або кількох аналізах коагуляції, аналізі протеолізу або аналізі TF-зв'язування, як описано у представленому описі.

У різних варіантах втілення кон'югований поліпептид виявляє біодоступність, яка становить принаймні приблизно 110% біодоступності контрольної композиції, наприклад, принаймні приблизно 120%, або принаймні приблизно 130%, або принаймні приблизно 140% біодоступності контрольної композиції.

В одному варіанті втілення кон'югований поліпептид виявляє півперіод у сироватці, який становить принаймні приблизно 125% півперіоду контрольної композиції, наприклад, принаймні приблизно 150%, або принаймні приблизно 200%, або принаймні приблизно 250% півперіоду контрольної композиції.

В одному варіанті втілення кон'югований поліпептид одержують шляхом ферментної модифікації сіалових або галактозних компонентів у поліпептиді.

В іншому аспекті винахід стосується способу одержання композиції за пунктом формули 1, спосіб включає етап контактування олігосахаридвмісного поліпептиду з молекулою полімеру за умов, у яких принаймні одна молекула полімеру є ковалентно зв'язаною з принаймні одним з олігосахаридних ланцюгів поліпептидів.

У ще одному аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, яка включає композицію, визначену в будь-якому з пунктів 1-22, та фармацевтично прийнятний носій або ад'ювант.

У ще одному аспекті винахід стосується застосування композиції, яка включає певну кількість поліпептидів Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, у яких поліпептиди включають аспарагін-зв'язані та/або серин-зв'язані олігосахаридні ланцюги, і принаймні одна олігосахаридна група є ковалентно зв'язаною з принаймні однією полімерною групою, для одержання медикаменту для лікування чутливого до Фактора VII синдрому.

У ще одному аспекті винахід стосується способу лікування чутливого до Фактора VII синдрому, спосіб включає введення фармацевтичної композиції, яка включає композицію, описану в пунктах 1-22, пацієнтові, який потребує такого лікування, за умов, які в результаті забезпечують зниження кровотечі та/або збільшення коагуляції крові.

В одному варіанті втілення синдром належить до групи, яка складається з гемофілії А, гемофілії В, дефіциту Фактора XI, дефіциту Фактора VII, тромбоцитопенії, хвороби фон Віллебранда, присутності інгібітора коагулюючого фактора, хірургічної операції, травми, антикоагулянтної терапії, включаючи дилуційну коагулопатію, крововиливу в мозок, трансплантації стовбурових клітин, кровотечі з верхніх відділів шлунково-кишкового тракту та хвороби печінки.

У ще одному аспекті винахід стосується способу профілактики небажаної кровотечі, спосіб включає введення фармацевтичної композиції, яка включає композицію, описану в пунктах 1-22, пацієнтові, який потребує такого лікування, за умов, які в результаті забезпечують зниження кровотечі та/або збільшення коагуляції крові.

У ще одному аспекті винахід стосується способу профілактики небажаної коагуляції крові, спосіб включає введення фармацевтичної композиції, яка включає композицію, описану в пунктах 1-22, пацієнтові, який потребує такого лікування, за умов, ефективних для інгібування коагуляції.

В одному варіанті втілення небажана коагуляція крові є пов'язаною зі станом, який належить до групи, яка складається з: ангіопластики, тромбозу глибокої вени, легеневої емболії, інсульту, дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції (DIC), відкладення фібрину в легенях та нирках у зв'язку з грам-негативною ендотоксемією, а також інфаркту міокарда.

У ще одному аспекті винахід стосується способу профілактики опосередкованих тканинним фактором реакцій, спосіб включає введення фармацевтичної композиції, яка включає композицію, описану в пунктах 1-22, пацієнтові, який потребує такого лікування, за умов, ефективних для інгібування коагуляції.

В одному варіанті втілення опосередковані тканинним фактором реакції є пов'язаними зі станом, який належить до групи, яка складається з запалення, раку, росту пухлин, метастазу, ангіогенезу, SIRS, ALI, ARDS, MOF, HUS та TTP.

Авторами було виявлено, що композиції коагулюючих білків, які мають структури глікоформи, у яких принаймні одна олігосахаридна група є ковалентно зв'язаною з принаймні однією полімерною групою, такою як, наприклад, ПЕГ, мають поліпшені функціональні властивості. Відповідним чином, даний винахід стосується способів та композицій, які забезпечують ці композиції кон'югованих білків. Зокрема, винахід стосується композицій, які включають поліпептиди Фактора VII та пов'язані з Фактором VII поліпептиди, які мають структури аспарагін-зв'язаних (N-зв'язаних) та серин-зв'язаних (O-зв'язаних) олігосахаридів, ковалентно зв'язаних з принаймні однією полімерною групою. Композиції згідно з винаходом виявляють змінені властивості, включаючи, крім інших, поліпшені

фармакокінетичні властивості та поліпшену клінічну ефективність. Винахід також охоплює фармацевтичні композиції, які включають ці композиції, а також терапевтичні способи, у яких застосовують ці композиції.

Вжитий у даному контексті термін "ковалентне зв'язування" означає, що олігосахаридний компонент та полімерна молекула є або прямо ковалентно зв'язаними одне з одним, або є непрямо ковалентно зв'язаними одне з одним через проміжний компонент або компоненти, наприклад, місток, спейсер або зв'язувальний компонент чи компоненти.

Термін "кон'югат" або рівнозначний термін "кон'югатний поліпептид" означає гетерогенну (комполімерну чи химерну) молекулу, утворену шляхом ковалентного зв'язування одного або кількох поліпептидів з однією або кількома молекулами полімеру.

Термін "полімерна молекула" або рівнозначні терміни "полімерна група" або "полімерний компонент" або "молекула полімеру", охоплює молекулу, здатну з'єднуватися зі з'єднувальною групою поліпептиду. Вжитий у контексті кон'югату згідно з винаходом, він означає, що молекула (або компонент) полімеру є зв'язаним з поліпептидною частиною кон'югату через з'єднувальну групу олігосахаридного ланцюга глікопротеїну; в оптимальному варіанті молекула полімеру є приєднаною до сіаловокислотного компонента, який закриває олігосахарид ("сіаловокислотої закриваючої групи"), або до галактозного компонента.

Молекула полімеру є молекулою, утвореною шляхом ковалентного зв'язування двох або кількох мономерів, причому жоден з мономерів не є амінокислотним залишком. Оптимальними полімерами є молекули полімерів, вибрані з групи, яка складається з поліалкіленоксиду (PAO), включаючи поліалкіленгліколь (PAG), наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ) та поліпропіленгліколь (PPG), розгалужені ПЕГ, полівініловий спирт (PVA), полікарбоксилат, полівінілпіролідон, поліетиленангідрид малеїнової кислоти, полістирол-ангідрид малеїнової кислоти та декстран, включаючи карбоксиметил-декстран, причому особливу перевагу віддають ПЕГ.

Термін "з'єднувальна група" означає функціональну групу олігосахаридного компонента, здатну приєднуватися до молекули полімеру. Корисними з'єднувальними групами є, наприклад, амін, гідроксил, карбоксил, альдегід, кетон, сульфгідрил, сукцинімідил, малеїмід, вінілсульфон або галоацетат.

З'єднувальна група на олігосахаридному компоненті може бути активована перед реакцією з полімером. В альтернативному варіанті група, присутня на полімері, може бути активована перед реакцією з олігосахаридним компонентом. Активована група, присутня на олігосахаридному або полімерному компоненті, може бути у формі активованої відщеплюваної групи.

Термін "активована відщеплювана група" охоплює компоненти, які легко замінюються в регульованих органічними каталізаторами або ферментами реакціях заміщення. Активовані відщеплювані групи є відомими спеціалістам.

[Див., наприклад, Vocadlo et al., In *Вуглевод Chemistry and Biology*, Vol 2, Wiley-VCH Verlag, Germany (2000); Kodama et al., *Tetrahedron Letters* 34:6419 (1993); Loughheed et al., *J. Biol. Chem.* 274:37717 (1999)].

Способи та хімічні умови активації полімерів описано в літературі. До загальновживаних способів активації полімерів належить активація функціональних груп ціаногенбромідом, перйодатом, глутаральдегідом, біепоксидами, епіхлорогідринном, дивінілсульфоном, карбодіімідом, сульфонілгалідами, трихлоротриазинном та ін. [див., наприклад, Taylor (1991), *Protein Immobilization, Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, N.Y.; Wong (1992), *Chemistry of protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton; Hermanson et al., (1993), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, N.Y.; Dunn et al., Eds. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, 1991].

Реактивними групами та класами реакцій, які застосовують у практичному втіленні даного винаходу, зазвичай є ті, які відбуваються за відносно м'яких умов. До них належать, крім інших, нуклеофільні заміщення (наприклад, реакція амінів та спиртів з ацилгалідами, активними естерами), електрофільні заміщення (наприклад, реакції енаміну) та додавання до зв'язків вуглець-вуглець та вуглець-гетероатом (наприклад, реакція Майкла, додавання Дільса-Альдера). Ці та інші корисні реакції описано, наприклад, у [публікаціях March, *Advanced Organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, N.Y. 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; Feeney et al., *Modifications of Proteins*, *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, 1982].

Реактивні функціональні групи вибирають таким чином, щоб вони не брали участі й не заважали реакціям, необхідним для з'єднання олігосахариду та полімерного компонента. В альтернативному варіанті реактивна функціональна група може бути захищена від участі у реакції наявністю захисної групи. Приклади корисних захисних груп див., наприклад, у [публікації Greene et al., *Protective groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, N.Y., 1991].

Загальні принципи зв'язування вуглеводів з іншими молекулами є відомими з літератури [див., наприклад, Lee et al., *Biochemistry* 28:1856 (1989); Bhatia et al., *Anal. Biochem.* 178:408 (1989); Janda et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112:8886 (1990); та Bednarski et al., *WO 92/18135*].

Термін "природний сайт глікозилювання" означає сайта глікозилювання у позиціях Asn-145 (N145), Asn-322 (N322), Ser-52 (S52) та Ser-60 (S60). Подібним чином, термін "природний *in vivo* сайт О-глікозилювання" охоплює позиції S52 та S60, тоді як термін "природний *in vivo* сайт N-глікозилювання" охоплює позиції N145 та N322.

Термін "функціональний *in vivo* півперіод" вживають у його нормальному значенні, тобто він означає час, протягом якого 50% біологічної активності поліпептиду або кон'югату зберігається в організмі/органі-мішені, або час, протягом якого активність поліпептиду або кон'югату становить



50% від початкового значення. Як альтернативу визначенню функціонального *in vivo* півперіоду визначають "півперіод у сироватці", тобто час, протягом якого 50% поліпептидних або кон'югатних молекул циркулюють у плазмі або потоці крові перш, ніж бути виведеними. Визначення півперіоду в плазмі часто буває простішим, ніж визначення функціонального півперіоду, і значення півперіоду в плазмі зазвичай дійсно відображає значення функціонального *in vivo* півперіоду. Альтернативними термінами для півперіоду в сироватці є півперіод у плазмі, циркуляційний півперіод, півперіод у системі кровообігу, кліренс із сироватки, кліренс із плазми та півперіод кліренсу. Поліпептид або кон'югат виводиться під дією однієї або кількох ретикулоендотеліальних систем (RES), нирки, селезінки або печінки, тканинним фактором, SEC-рецептором або іншим опосередкованим рецептором шляхом видалення, або специфічним чи неспецифічним протеолізом. Зазвичай кліренс залежить від розміру (відносно граничного значення для гломерулярної фільтрації), заряду, приєднаних вуглеводних ланцюгів та присутності клітинних рецепторів для білка. Функціональність, яка має зберігатися, зазвичай вибирають з-поміж прокоагулянтної, протеолітичної, кофактор-зв'язувальної або рецептор-зв'язувальної активності. Функціональний *in vivo* півперіод та півперіод у сироватці визначають відповідним способом, відомим серед спеціалістів, як детально обговорюється нижче (див. Розділ Функціональні властивості композицій Фактора VII).

Термін "збільшений", вжитий стосовно функціонального *in vivo* півперіоду або півперіоду у плазмі, застосовують для позначення того, що відповідний півперіод поліпептиду або кон'югату є статистично значно збільшеним відносно показника контрольної молекули, наприклад, некон'югованого Фактора VIIa (наприклад, FVIIa дикого типу) при визначенні за порівнюваних умов. Наприклад, відповідний півперіод може бути збільшений принаймні на приблизно 25%, наприклад, принаймні на приблизно 50%, наприклад, принаймні на приблизно 100%, 150%, 200%, 250% або 500%.

"Імуногенність" композиції стосується здатності композиції, при введенні людині, викликати шкідливу імунну реакцію, гуморальну, клітинну або й ту, й іншу. Про поліпептиди Фактора VIIa та пов'язані з Фактором VIIa поліпептиди не відомо, що вони викликають помітні імунні реакції в людини. Незважаючи на це, у будь-якій людській субпопуляції можуть існувати особи, які виявляють чутливість до конкретних введених білків. Імуногенність вимірюють шляхом кількісного визначення присутності антитіл проти Фактора VII та/або чутливих до Фактора VII Т-клітин у чутливої особи, застосовуючи традиційні способи, відомі спеціалістам у даній галузі. У деяких варіантах втілення композиції згідно з даним винаходом виявляють зменшення імуногенності у чутливої особи принаймні приблизно на 10%, в оптимальному варіанті - принаймні приблизно на 25%, ще краще - принаймні приблизно на 40%, і найкраще - принаймні приблизно на 50% відносно імуногенності у цієї особи до контрольної композиції.

Термін "амінокислотні залишки, які відповідають амінокислотним залишкам S52, S60, N145, N322 з Фіг. (FVII wt.)" означає Asn та Ser амінокислотні залишки, які відповідають послідовності Фактора VII дикого типу (Фіг.), якщо послідовності вирівняти. Гомологію/ідентичність амінокислотних послідовностей легко визначити за випрямленими послідовностями, застосовуючи відповідну комп'ютерну програму для випрямлення послідовностей, наприклад, програму ClustalW program, версія 1.8, 1999p. [Thompson et al., 1994, Nucleic Acid Research, 22: 4673-4680].

Поліпептиди Фактора VIIa пов'язані з Фактором VII поліпептиди

Даний винахід охоплює людські поліпептиди Фактора VII, наприклад, ті, що мають амінокислотну послідовність, описану в патенті США №4,784,950 (Фактор VII дикого типу). Вжитий авторами термін "Фактор VII" або "поліпептид Фактора VII" охоплює Фактор VII дикого типу, а також варіанти Фактора VII, які виявляють практично таку саму або поліпшену біологічну активність відносно Фактора VII дикого типу. Термін "Фактор VII" охоплює поліпептиди Фактора VII у їхній нерозщепленій (зимогенній) формі, а також ті, які було протеолітично оброблено для одержання їх відповідних біологічно активних форм, які можуть бути позначені як Фактор VIIa. Зазвичай Фактор VII розщеплюють між залишками 152 та 153 для одержання Фактора VIIa.

Вжитий авторами термін "пов'язані з Фактором VII поліпептиди" охоплює поліпептиди, включаючи варіанти, у яких біологічну активність Фактора VIIa було суттєво змінено або знижено відносно активності Фактора VIIa дикого типу. До цих поліпептидів належать, крім інших, Фактор VII або Фактор VIIa, які були хімічно модифіковані, та варіанти Фактора VII, у які було введено зміни конкретних амінокислотних послідовностей, які змінюють або порушують біоактивність поліпептиду.

Біологічна активність Фактора VIIa у коагуляції походить від його здатності (i) зв'язуватися з тканинним фактором (TF) та (ii) каталізувати протеолітичне розщеплення Фактора IX або Фактора X для вироблення активованого Фактора IX або X (Фактора IXa або Xa, відповідно). З точки зору винаходу біологічна активність Фактора VIIa може бути кількісно визначена шляхом вимірювання здатності композиції сприяти коагуляції крові з застосуванням плазми без Фактора VII та тромбопластину, як описано, наприклад, у патенті США №5,997,864. У цьому аналізі біологічну активність виражають як зменшення часу коагуляції відносно контрольного зразка і перетворюють на "одиниці Фактора VII" шляхом порівняння з об'єднаним стандартом людської сироватки, що містить 1од./мл активності Фактора VII. В альтернативному варіанті біологічну активність Фактора VIIa кількісно визначають шляхом (i) вимірювання здатності Фактора VIIa виробляти Фактор Xa у системі, яка включає TF, вставлений у ліпідну мембрану та Фактор X. [Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997]; (ii) вимірювання гідролізу Фактора X у водній системі (див. Приклад 5 нижче); (iii) вимірювання його фізичного зв'язування з TF з застосуванням інструмента на основі поверхневого пла-

змонного резонансу (Persson, FEBS Lett. 413:359-363, 1997) (iv) вимірювання гідролізу синтетичного субстрату (див. Приклад 4 нижче); та (v) вимірювання утворення тромбіну у TF-незалежній *in vitro* системі.

До варіантів Фактора VII, які мають практично таку саму або поліпшену біологічну активність відносно Фактора VII дикого типу, належать ті, що виявляють принаймні приблизно 25%, в оптимальному варіанті - принаймні приблизно 50%, ще краще - принаймні приблизно 75%, і найкраще - принаймні приблизно 90% специфічної активності Фактора VIIa дикого типу, який вироблявся у тому самому типі клітин, при випробуванні в одному або кількох аналізах коагуляції, аналізі протеолізу або аналізі TF-зв'язування, як описано вище. Варіантами Фактора VII, які мають значно знижену біологічну активність відносно Фактора VII дикого типу, є ті, що виявляють менше, ніж приблизно 25%, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 10%, ще краще - менше, ніж приблизно 5%, і найкраще - менше, ніж приблизно 1% специфічної активності Фактора VIIa дикого типу, який вироблявся у тому самому типі клітин, при випробуванні в одному або кількох аналізах коагуляції, аналізі протеолізу або аналізі TF-зв'язування, як описано вище. До варіантів Фактора VII, які мають значно змінену біологічну активність відносно Фактора VII дикого типу, належать, крім інших, варіанти Фактора VII, які виявляють TF-незалежну протеолітичну активність Фактора X, та ті, що зв'язуються з TF, але не розщеплюють Фактор X.

До варіантів Фактора VII, які виявляють практично таку саму або кращу біоактивність, ніж у Фактора VII дикого типу або, в альтернативному варіанті, виявляють суттєво змінену або знижену біоактивність відносно Фактора VII дикого типу, належать, крім інших, поліпептиди, які мають амінокислотну послідовність, яка відрізняється від послідовності Фактора VII дикого типу вставленням, видаленням або заміщенням однієї або кількох амінокислот.

Необмежувальними прикладами пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, які мають практично таку саму або поліпшену біологічну активність, що й Фактор VII дикого типу, є S52A-FVII, S60A-FVII [Iino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998]; L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L355I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII та S336G-FVII; FVIIa варіанти, які виявляють збільшену протеолітичну стійкість, як описано у патенті США №5,580,560; Фактор VIIa, який було протеолітично розщеплено між залишками 290 та 291 або між залишками 315 та 316 [Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995]; окиснені форми Фактора VIIa [Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999], варіанти послідовності Фактора VII, у яких амінокислотний залишок у позиціях 290 та/або 291 (з Фіг.), в оптимальному варіанті - 290,

було заміщено, та варіанти послідовності Фактора VII, у яких амінокислотний залишок у позиціях 315 та/або 316 (з Фіг.), в оптимальному варіанті - 315, було заміщено.

Необмежувальними прикладами пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, які мають практично таку саму або поліпшену біологічну активність, що й Фактор VII дикого типу, також є: FVII варіанти, які мають збільшену біологічну активність порівняно з FVIIa дикого типу, як описано у WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/77218, WO 03/27147 та WO 03/37932, включаючи, крім інших, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, та S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337AM298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,

S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-  
 FVII, K316H/L305V/E296V-FVII,  
 K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-  
 FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII,  
 K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/K337A/E296V-FVII,  
 K316H/L305V/K337A/V158D-FVII,  
 K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158D/E296V-FVII,  
 K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158T/E296V-FVII,  
 K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,  
 K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,  
 K316H/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII,  
 K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-  
 FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII,  
 K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-  
 FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII,  
 K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII,  
 K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII,  
 K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII,  
 K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVIII,  
 K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII,  
 F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII,  
 F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-  
 FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-  
 FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII,  
 F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-  
 FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-  
 FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-  
 FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/S314E/3/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-  
 FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII,  
 F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII,  
 F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII,  
 F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII,  
 F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII,

F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,  
 F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII,  
 F374Y/IC337A/S314E/M298Q-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII,  
 F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII,  
 F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII,  
 F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,  
 F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII,  
 F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII,  
 F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,  
 F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII,  
 F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII,  
 F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII,  
 F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII,  
 F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII,  
 F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,  
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/L305VAA158T/E296V/K337A-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-  
 FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-  
 FVII, S52A-Фактор VII, 860A-Фактор VII; та  
 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII,  
 V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII,  
 R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-  
 FVII; FVII, що має заміщення, включення або де-  
 лєції в амінокислотній послідовності від 233Thr до  
 240Asn, FVII, що має заміщення, включення або

делеції в амінокислотній послідовності від 304Arg до 329Cys, та FVII, що має заміщення, делеції, включення в амінокислотній послідовності Ile53-Arg223.

Необмежувальними прикладами пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, які мають значно знижену або змінену біологічну активність відносно Фактора VII дикого типу, є R152E-FVIIa [Wildgoose et al., Biochem 29:3413-3420, 1990], S344A-FVIIa [Kazama et al., J. Biol. Chem. 270:66-72, 1995], FFR-FVIIa [Hoist et al., Eur. J. Vase. Endovasc. Surg. 15:515-520, 1998], Фактор VIIa без Gla-домену [Nicolaisen et al., FEBS Letts. 317:245-249, 1993] та Фактор VII, у якому Lys341 було заміщено Ala. Необмежувальними прикладами хімічно модифікованих поліпептидів Фактора VII та варіанти послідовності описано, наприклад, у патенті США №5,997,864.

#### Глікозидування

Вжиті авторами терміни "характер" глікозилювання або "структура", "розподіл" або "спектр" глікоформи стосується представлення конкретних олігосахаридних структур у даній популяції поліпептидів Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів. Необмежувальними прикладами таких структур є відносна пропорція олігосахаридних ланцюгів, які (i) мають принаймні один сіалово-кислотний залишок; (ii) не мають жодного сіалово-кислотного залишку (тобто мають нейтральний заряд); (iii) мають принаймні один кінцевий галактозний залишок; (iv) мають принаймні одну "незакриту" антену, тобто мають принаймні один кінцевий галактозний або N-ацетилгалактозамінний залишок; або (vi) мають принаймні одну фукозу, зв'язану  $\alpha 1 \rightarrow 3$  з антенним N-ацетилглюкозамінним залишком.

Вжитий авторами термін "олігосахаридний ланцюг" стосується всієї структури олігосахаридів, яка є ковалентно зв'язаною з одним амінокислотним залишком. Фактор VII зазвичай є глікозилованим у Asn 145 та Asn 322 (N-зв'язане глікозилювання) і Ser-52 та Ser-60 (O-зв'язане глікозилювання). N-зв'язаний олігосахаридний ланцюг, присутній у Факторі VII, який виробляється в людині *in situ*, може бути дво-, три- або чотириантенним, причому кожна антена має структуру Neu5Ac( $\alpha 2 \rightarrow 3$  або  $\alpha 2 \rightarrow 6$ )Gal( $\beta 1 \rightarrow 4$ )GlcNAc, зв'язану ( $\beta 1 \rightarrow 2$ , 4 або 6) з Man-залишком, який є зв'язаним ( $\alpha 1 \rightarrow 3$  або 6) з Man( $\beta 1 \rightarrow 4$ )GlcNAc( $\beta 1 \rightarrow 4$ )GlcNAc-Asn. (Neu5Ac означає N-ацетилнейрамінову кислоту (сіалову кислоту), Gal означає галактозу, GlcNAc означає N-ацетилглюкозамін, і Man означає манозу). Олігосахаридні ланцюги також можуть включати фукозні залишки, які можуть бути зв'язані  $\alpha 1 \rightarrow 6$  з GlcNAc.

O-зв'язаний олігосахаридний ланцюг, присутній у Факторі VII, який виробляється у людини *in situ*, є одноантенним з антеною Ser-52, що має структуру Xyl-Xyl-Glc-Ser або Glc-Ser, та антеною Ser-60, що має структуру Neu5Ac( $\alpha 2 \rightarrow 3$  або  $\alpha 2 \rightarrow 6$ )Gal( $\beta 1 \rightarrow 4$ )GlcNAc-Fuc-Ser або Fuc-Ser (Fuc означає фукозу, Glc означає глюкозу, і Xyl означає ксилізу).

Коли Фактор VII виробляється у людині *in situ*, деякі з N-зв'язаних олігосахаридних ланцюгів не мають центральних фукозних залишків; усі ланцю-

ги не мають антенних фукозних залишків; і обидва з N-зв'язаних ланцюгів є майже повністю сіалілованими, тобто кінцевий цукор кожної антени є N-ацетилнейраміною кислотою, зв'язаною з галактозою через зв'язок  $\alpha 2 \rightarrow 3$  або  $\alpha 2 \rightarrow 6$ .

Однак, при виробленні за інших обставин Фактор VII може містити олігосахаридні ланцюги, які мають інші кінцеві структури на одній або кількох із їх антен, наприклад, такі, що не мають сіалово-кислотних залишків; такі, що мають N-гліколілнейраміново-кислотні (Neu5Gc) залишки; такі, що мають кінцевий N-ацетилгалактозамінний (GalNAc) залишок замість галактози; та інші. При виробленні, наприклад, у ВНК-клітинах, культивованих у присутності телячої сироватки, композиції Фактора VII мають такі олігосахаридні структури: 87-93% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіалово-кислотний залишок; 7-13% є нейтральними (не мають ніякої сіалової кислоти); 9-16% містять принаймні один кінцевий галактозний залишок; 19-29% містять принаймні один кінцевий N-ацетилгалактозамінний залишок; і 30-39% містять принаймні одну незакриту антену, тобто містять принаймні один кінцевий галактозний або N-ацетилгалактозамінний залишок.

При виробленні в інших типах клітин або за інших умов культивування (у вільному від сироватки, повністю хімічно визначеному середовищі), композиція Фактора VII може мати такі олігосахаридні структури [як описано у WO 02/29025]:

(i) Приблизно 94-100% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіалово-кислотний залишок, наприклад, приблизно 94-99%, приблизно 95-98% або приблизно 96-97%. У різних варіантах втілення принаймні приблизно 94%, 95%, 96% або 97% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіалово-кислотний залишок.

(ii) 6% або менше олігосахаридних ланцюгів є нейтральними, наприклад, приблизно 1,5-6% або приблизно 2-4%.

(iii) Менше, ніж приблизно 16%, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 10% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну кінцеву галактозу, наприклад, приблизно 6-10% або приблизно 8-9%;

(iv) Менше, ніж приблизно 25%, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 10% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один кінцевий GalNAc-залишок, наприклад, приблизно 6-9% або приблизно 7-8%;

(v) Менше, ніж приблизно 30, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 25% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену, наприклад, приблизно 11-23% або приблизно 12-18%; і

(vi) Принаймні приблизно 2%, в оптимальному варіанті - принаймні приблизно 5%, ще краще - принаймні приблизно 10% або 20%; і найкраще - принаймні приблизно 40% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одні фукозу, зв'язану  $\alpha 1 \rightarrow 3$  з антенним N-ацетилглюкозамінним залишком (тобто N-ацетилглюкозамінним залишком, який є зв'язаним  $\beta 1 \rightarrow 2$ , 4 або 6 з Man-залишком).

Крім того, ступінь сіалілювання (тобто кількість сіалово-кислотних залишків, приєднаних до кожного олігосахаридного ланцюга) може бути поліпше-

ний шляхом піддавання композиції експресованого Фактора VII або пов'язаного з Фактором VII поліпептиду *in vitro* ферментній обробці сіалілтрансферазою та донорною молекулою сіалової кислоти, наприклад, як описано у US 6,399,336. Таким чином практично всі антени на олігосахаридних ланцюгах можуть бути сіалілованими (тобто "закритими" сіаловокислотним залишком). У деяких випадках N-глюкани на пов'язаному з FVII або FVII поліпептиді також не є повністю галактозилуваними, і етап галактозилування з застосуванням галактозилтрансферази та донорного субстрату UDP-галактози перед етапом сіалілування поліпшує вміст сіалової кислоти у продукті.

Автори винаходу одержали композиції Фактора VII, які містять олігосахаридні структури, що містять принаймні одну полімерну групу, ковалентно зв'язану з принаймні однією олігосахаридною групою. В одному варіанті втілення композиції включають поліпептиди Фактора VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди, які мають одну або кілька таких структур глікоформи:

(i) Приблизно 94-100% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіаловокислотний залишок, наприклад, приблизно 94-99%, приблизно 95-98% або приблизно 96-97%. У різних варіантах втілення принаймні приблизно 94%, 95%, 96%, 97%, 98 або 99% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіаловокислотний залишок.

(ii) 6% або менше олігосахаридних ланцюгів є нейтральними, наприклад, приблизно 0,5-6% або 1,5-6% або приблизно 2-4% або 0,5-4% або 0,5-2%.

(iii) Менше, ніж приблизно 16%, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 10% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну кінцеву галактозу, наприклад, приблизно 6-10% або приблизно 8-9%;

(iv) Менше, ніж приблизно 25%, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 10% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один кінцевий GalNAc залишок, наприклад, приблизно 6-9% або приблизно 7-8%;

(v) Менше, ніж приблизно 30, в оптимальному варіанті - менше, ніж приблизно 25% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну незакриту антену, наприклад, приблизно 11-23% або приблизно 12-18%; і

(vi) Принаймні приблизно 2%, в оптимальному варіанті - принаймні приблизно 5%, ще краще - принаймні приблизно 10% або 20%; і найкраще - принаймні приблизно 40% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні одну фукозу, зв'язану  $\alpha 1 \rightarrow 3$  з антенним N-ацетилглюкозамінним залишком (тобто N-ацетилглюкозамінним залишком, який є зв'язаним  $\beta 1 \rightarrow 2$ , 4 або 6 з Man-залишком).

Слід розуміти, що кожен з (i)-(vi) може представляти окрему структуру глікоформи, яка охоплюється варіантами втілення даного винаходу, тобто структура глікоформи композиції згідно з даним винаходом, у якій принаймні одна полімерна група є ковалентно зв'язаною з принаймні одним олігосахаридом, може бути описана лише одним з (i)-(vi). В альтернативному варіанті структура глікоформи композиції, яка охоплюється ви-

находом, може бути описана більш, ніж одним з (i)-(vi).

Крім того, композиція, яка охоплюється винаходом, може бути описана одним або кількома (i)-(vi) у комбінації з однією або кількома структурними особливостями. Наприклад, винахід охоплює композиції, які включають поліпептиди Фактора VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди, у яких сіаловокислотні залишки (Neu5Ac або Neu5Gc) є зв'язаними з галактозою виключно у  $\alpha 2 \rightarrow 3$  конфігурації. Винахід також охоплює композиції, які включають поліпептиди Фактора VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди, які містять фукозу, зв'язану  $\alpha 1 \rightarrow 6$  з центральним N-ацетилглюкозаміном, та/або фукозу, зв'язану  $\alpha 1 \rightarrow 3$  з антенним N-ацетилглюкозаміном. В одній серії варіантів втілення композиції згідно з винаходом включають Фактор VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди, у яких понад 99% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіаловокислотний залишок і (а) сіаловокислотні залишки є зв'язаними виключно у  $\alpha 2 \rightarrow 3$  конфігурації, і/або (б) існують фукозні залишки, зв'язані з центральними N-ацетилглюкозаминами, і/або (в) певна кількість антен закінчується в N-ацетилгалактозаміні. В одному варіанті втілення винахід охоплює композиції, які включають Фактор VIIа дикого типу, у яких понад 99% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіаловокислотний залишок і сіаловокислотні залишки є зв'язаними з галактозою виключно у  $\alpha 2 \rightarrow 3$  конфігурації. В іншому варіанті втілення винахід охоплює композиції, які включають Фактор VIIа дикого типу, у якому понад 99% олігосахаридних ланцюгів містять принаймні один сіаловокислотний залишок, і принаймні деякі олігосахаридні ланцюги включають N-ацетилгалактозамін.

Структуру N-зв'язаних та/або O-зв'язаних олігосахаридів визначають, застосовуючи будь-який спосіб, відомий спеціалістам у даній галузі, включаючи, крім інших: високоефективну рідинну хроматографію (HPLC); капілярний електрофорез (CE); ядерний магнітний резонанс (NMR); мас-спектрометрію (MS) з застосуванням способів іонізації наприклад, бомбардування швидкими атомами, електророзпилення або матричну лазерну іонізацію десорбцією (MALDI); газову хроматографію (GC); та обробку екзоглікозидазами у поєднанні з аніонообмінною (AIE)-HPLC, хроматографією з виключенням за розміром (SEC), мас-спектроскопією (MS), гелевим електрофорезом (SDS-PAGE, CE-PAGE), ізоелектрофокусуванням у гелях або капілярним електрофорезом з ізоелектрофокусуванням (CE-IEF). [Див., наприклад, Weber et al., Anal. Biochem. 225:135 (1995); Klausen et al., J. Chromatog. 718:195 (1995); Morris et al., Mass Spectrometry of Biological Materials, McEwen et al., eds., Marcel Dekker, (1990), pp. 137-167; Conboy et al., Biol. Mass Spectrom. 21:397, 1992; Hellerqvist, Meth. Enzymol. 193:554 (1990); Sutton et al., Anal. Biochem. 318:34 (1994); Harvey et al., Organic Mass Spectrometry 29:752 (1994)].

Після розкладення похідних від Фактора VII олігосахаридних ланцюгів із застосуванням вищезазначених способів (або будь-якого іншого способу, який дозволяє виділяти олігосахаридні ланцю-

ги, які мають різні структури) виділені зразки відносять, наприклад, до однієї з груп (i)-(vi). Відносний вміст кожного з (i)-(vi) розраховують як суму олігосахаридів, віднесених до даної групи відносно загального вмісту олігосахаридних ланцюгів у зразку.

Наприклад, застосовуючи AIE-HPLC, із композиції рекомбінантного Фактора VII, що виробляється у ВНК-клітинах [див., наприклад, Klausen et al., Mol. Biotechnol. 9:195, 1998] можна виділити 13 або більше N-зв'язаних олігосахаридних піків. П'ять піків (позначених 1-5 у Klausen et al.) не містять сіалової кислоти, тоді як вісім піків (позначені 6, 7 та 10-15) містять сіалову кислоту.

Слід розуміти, що у даному аналізі кількість та розподіл ланцюгів, які містять сіалову кислоту, та ланцюгів, які не містять сіалової кислоти, може залежати від (а) поліпептиду, який експресується; (б) типу клітин та умов культури; (в) будь-якої модифікації структури глікоформи шляхом хімічної та/або ферментної обробки після експресії та (г) застосованого способу аналізу, який в результаті може відповідним чином змінити структуру.

У будь-якому разі, відразу після відокремлення олігосахаридів, що містять сіалову кислоту, від неолігосахаридних сполук, що містять сіалову кислоту, застосовують традиційні програми аналізу даних для розрахунку площі під кожним піком; загальну площу під піками; та відсоток від загальної площі під піками, представлений конкретним піком. Таким чином, для конкретної композиції сума площ піків, що містять сіалову кислоту/загальної площі під піками X 100 дає % показник сіалілування для композиції згідно з даним винаходом (тобто пропорція олігосахаридних ланцюгів, що містять принаймні один сіаловоокислотний залишок). Подібним чином може бути розрахований % ланцюгів, які не мають сіалової кислоти або принаймні однієї галактози або N-ацетилглюкозаміну.

#### Полімери

Молекулою полімеру, яка має бути з'єднана з поліпептидом, може бути будь-яка прийнятна молекула, наприклад, природний або синтетичний гомополімер або гетерополімер, зазвичай з молекулярною масою у межах приблизно 300-100000Да, наприклад, приблизно 500-20000Да, або приблизно 500-15000Да, або 2-15кДа, або 3-15кДа, або 3-12кДа, або приблизно 10кДа. Якщо вживається термін "приблизно" у зв'язку з певною молекулярною масою, то слово "приблизно" означає приблизний середній розподіл молекулярної маси у даній полімерній композиції.

Прикладами гомополімерів є поліспирти (тобто полі-ОН), поліаміни (тобто полі-NH<sub>2</sub>) та полікарбонові кислоти (тобто полі-COOH). Гетерополімером є полімер, який включає різні з'єднувальні групи, наприклад, гідроксильну групу та амінну групу.

Прикладами прийнятних молекул полімерів є молекули полімерів, вибрані з групи, яка складається з поліалкіленоксиду (PAO), включаючи поліалкіленгліколь (PAG), наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ) та поліпропіленгліколь (PPG), розгалужених ПЕГ, полівінілового спирту (PVA), полікарбоксилату, полівінілпіролідону, поліетиленангідриду малеїнової кислоти, полістирол-

ангідриду малеїнової кислоти, декстрану, включаючи карбоксиметил-декстран, поліуретан, поліестер та поліамід, або будь-який інший полімер, придатний для зниження імуногенності та/або збільшення функціонального *in vivo* півперіоду та/або півперіоду в сироватці. Взагалі, похідні від поліалкіленгліколю полімери є біосумісними, нетоксичними, неантигенними і неімуногенними, мають різні властивості розчинності у воді й легко секретуються з живих організмів.

ПЕГ є оптимальною молекулою полімеру, оскільки вона має лише кілька реактивних груп, здатних до зшивання, порівняно, наприклад, із полісахаридами, наприклад, декстраном. Зокрема, монофункціональний ПЕГ, наприклад, метоксиполіетиленгліколь (mPEG) викликає інтерес, оскільки хімія його з'єднання є відносно простою (існує лише одна реактивна група для кон'югації зі з'єднувальними групами на олігосахариді). Отже, ризик зшивання усувається, і утворені в результаті поліпептидні кон'югати є більш гомогенними, і реакцію молекул полімерів з поліпептидом легше контролювати.

Для здійснення ковалентного зв'язування молекул(и) полімеру(ів) з поліпептидом гідроксильні кінцеві групи молекули полімеру повинні бути в активованій формі, тобто з реактивними функціональними групами (прикладами яких є первинні аміно-групи, гідразид (HZ), тіол, сукцинат (SUC), сукцинімідилсукцинат (SS), сукцинімідилсукцинамід (SSA), сукцинімідилпропіонат (SPA), сукцинімідилкарбоксиметилат (SCM), бензотриазолкарбонат (BTC), N-гідроксисукцинімід (NHS), альдегід, нітрофенілкарбонат (NPC) та трезилат (TRES)). Прийнятними молекулами активованих полімерів є ті, що виробляються серійно, наприклад, компаніями Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA, або PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK. В альтернативному варіанті молекули полімерів можуть бути активовані традиційними способами, відомими спеціалістам у даній галузі, наприклад, як описано у WO 90/13540. Конкретні приклади активованих лінійних або розгалужених молекул полімерів для застосування у даному винаході описано у [публікації Shearwater Polymers, Inc. 1997 and 2000 Catalogs (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and Pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives), включеній авторами шляхом посилання].

Конкретними прикладами активованих ПЕГ-полімерів є такі лінійні ПЕГ: NHS-ПЕГ (наприклад, SPA-ПЕГ, SSPA-ПЕГ, SBA-ПЕГ, SS-ПЕГ, SSA-ПЕГ, SC-ПЕГ, SG-ПЕГ та SCM-ПЕГ) і NOR-ПЕГ, BTC-ПЕГ, EPOX-ПЕГ, NCO-ПЕГ, NPC-ПЕГ, CDI-ПЕГ, ALD-ПЕГ, TRES-ПЕГ, VS-ПЕГ, IODO-ПЕГ та MAL-ПЕГ і розгалужені ПЕГ наприклад, PEG2-NHS та описані у US 5,932,462 та US 5,643,575, обидва з яких є включеними авторами шляхом посилання. Крім того, у нижчезазначених публікаціях, включених авторами шляхом посилання, описано корисні молекули полімерів та/або хімічні способи ПЕГілювання: US 5,824,778, US 5,476,653, WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, US 4,902,502, US 5,281,698, US 5,122,614, US 5,219,564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO

94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921131, US 5,736,625, WO 98/05363, EP 809996, US 5,629,384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5,473,034, US 5,516,673, EP 605963, US 30 5,382,657, EP 510356, EP 400472, EP 183503 та EP 154316.

Кон'югацію олігосахаридних ланцюгів поліпептиду та активованих молекул полімерів здійснюють шляхом застосування будь-якого традиційного способу. Традиційні способи є відомими спеціалістам у даній галузі.

Спеціалістові у даній галузі відомо, що спосіб активації та/або хімічні способи кон'югації, які мають застосовуватися, залежать від з'єднувальної(их) групи (груп) олігосахариду(ів), а також функціональних груп молекули полімеру (наприклад, аміну, гідроксилу, карбоксилу, альдегіду, кетону, сульфгідрилу, сукциніміди, малеїміду, вінілсульфону або галоацетату).

Слід розуміти, що кон'югацію полімеру сплановано таким чином, щоб утворилася оптимальна молекула щодо кількості приєднаних молекул полімерів, розміру та форми таких молекул (наприклад, чи є вони лінійними, чи розгалуженими) та місця (місць) приєднання в олігосахаридному(их) ланцюгу(ах). Молекулярну масу застосовуваного полімеру вибирають, наприклад, на основі потрібного ефекту, який має бути досягнутий. Наприклад, якщо первинною метою кон'югації є досягнення кон'югату, який має високу молекулярну масу (наприклад, для зниження ниркового кліренсу), зазвичай бажано кон'югувати якомога менше молекул полімерів високої молекулярної маси для досягнення потрібної молекулярної маси.

Винахід також передбачає з'єднання молекул полімерів з поліпептидом через лінкер. Придатні лінкери є загальновідомими серед спеціалістів. Оптимальним прикладом є ціануриновий хлорид [Abuchowski et al., (1977), J. Biol. Chem., 252, 3578-3581; US 4,179,337; Shafer et al., (1986), J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 24, 375-378]. Після кон'югації залишкові молекули активованих полімерів блокують способами, відомими спеціалістам у даній галузі, наприклад, шляхом додавання первинного аміну до реакційної суміші, і утворені в результаті молекули інактивованих полімерів видаляють відповідним способом. Такі способи є загальновідомими серед спеціалістів; [див., наприклад, March, *Advanced Organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, N.Y. 1985; Greene et al., *Protective groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, N.Y., 1991; Taylor (1991), *Protein Immobilization, Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, N.Y.; Wong (1992), *Chemistry of protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton; Hermanson et al., (1993), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, N.Y.; Dunn et al., Eds. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, 1991].

Слід розуміти, що залежно від обставин, наприклад амінокислотної послідовності поліпептиду, характеристики застосовуваної активованої ПЕГ-сполуки та конкретних умов ПЕГілювання, включаючи молярне співвідношення ПЕГ з поліпептидом, можна досягати різних ступенів ПЕГілювання, причому більш високого ступеня ПЕГілювання зазвичай досягають при вищому співвідношенні ПЕГ з поліпептидом. Однак ПЕГілювані поліпептиди, які утворюються в результаті будь-якого процесу ПЕГілювання, зазвичай мають стохастичний розподіл поліпептидних кон'югатів, які мають дещо різні ступені ПЕГілювання.

У цікавому варіанті втілення винаходу поліпептидний кон'югат згідно з даним винаходом включає молекулу полімеру, ковалентно зв'язану з однією з сіаловокислотних груп, розташованих на кінці олігосахаридної групи поліпептиду Фактора VII, причому вищезгадана молекула полімеру є єдиною молекулою полімеру, приєднаною до поліпептиду. В іншому варіанті втілення дві молекули полімерів є ковалентно зв'язаними з однією або кількома олігосахаридними групами поліпептиду Фактора VII; в інших варіантах втілення три, чотири, п'ять, шість або сім молекул полімерів є ковалентно зв'язаними з поліпептидом Фактора VII.

В одному варіанті втілення поліпептид Фактора VII є поліпептидом FVU дикого типу або поліпептидом FVIIa, показаним на Фіг.; в іншому варіанті втілення поліпептид Фактора VII є пов'язаним з Фактором VII поліпептидом; в одному варіанті втілення пов'язаний з Фактором VII поліпептид є варіантом амінокислотної послідовності Фактора VII.

В оптимальному варіанті такими поліпептидними кон'югатами є ті, які включають єдину молекулу ПЕГ. Зокрема, перевагу віддають лінійній або розгалуженій молекулі ПЕГ з молекулярною масою принаймні приблизно 5кДа, зокрема, приблизно 10-25кДа, наприклад, приблизно 15-25кДа, наприклад, приблизно 20кДа або приблизно 10кДа.

В оптимальному варіанті у кон'югаті згідно з винаходом кількість та молекулярну масу полімерної молекули вибирають таким чином, щоб загальна молекулярна маса, складена полімерною молекулою, була у межах 5-25кДа, наприклад, у межах 10-25кДа, приблизно 5кДа, приблизно 10кДа, приблизно 15кДа або приблизно 20кДа.

Способи одержання полімер-зв'язаних композицій Фактора VII, які мають задану структуру олігосахаридів

Способи одержання композицій Фактора VII: Фактор VII, варіанти Фактора VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди одержують, застосовуючи будь-яку придатну клітину-хазяїн, яка експресує глікозилований Фактор VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди (тобто клітини-хазяї, здатні приєднуватися до олігосахаридних груп в сайтах глікозилювання поліпептиду). Фактор VII також може бути виділений з плазми людини або інших видів.

У деяких варіантах втілення клітини-хазяї є людськими клітинами, які експресують ендогенний ген Фактора VII. У цих клітинах ендогенний ген може бути інтактним або може бути модифікованим *in situ*, або послідовність за межами гена Фактора VII може бути модифікованою *in situ* для змі-

ни експресії ендогенного гена Фактора VII. Може бути застосована будь-яка людська клітина, здатна експресувати ендогенний ген Фактора VII.

В інших варіантах втілення гетерологічні клітини-хазяї є запрограмованими на експресію людського Фактора VII з рекомбінантного гена. Клітини-хазяї можуть бути клітинами хребетних, комах або грибків. В оптимальному варіанті клітини є клітинами ссавців, здатними на повний спектр N-зв'язаного глікозилування у ссавців; O-зв'язаного глікозилування; та  $\gamma$ -карбоксилування. Див., наприклад, Патент США №4,784,950. До оптимальних ліній клітин ссавців належать лінії клітин CHO (ATCC CCL 61), COS-1 (ATCC CRL 1650), нирок новонароджених хом'яків (BHK) та HEK293 [ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977]. Оптимальною лінією клітин BHK є лінія клітин tk<sup>-</sup> ts13 BHK [Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982], які далі називаються клітинами BHK 570. Лінію клітин BHK 570 отримують від Американського зібрання типових культур [American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852] під інвентарним номером ATCC CRL 10314. Лінію клітин tk<sup>-</sup> ts13 BHK також можна отримати від ATCC під інвентарним номером CRL 1632. Крім того, може бути застосовано багато інших ліній клітин, включаючи клітини Rat Hep I (гепатома щура; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (гепатома щура; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), легенів людини (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) та клітини DUKX (лінія клітин CHO) [Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980]. (клітини DUKX також називають клітинами CXB11) та DG44 (лінія клітин CHO) [Cell, 33:405, 1983, та Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555, 1986]. Також застосовують клітини 3T3, клітини Namalwa, міеломи та злиття міелом з іншими клітинами. У варіанті втілення, якому віддають особливу перевагу, клітинами-хазяями є клітини BHK 21, які було адаптовано до росту за відсутності сироватки і які є запрограмованими на експресію Фактора VII. У деяких варіантах втілення клітини можуть бути мутантними або рекомбінантними клітинами, які експресують якісно або кількісно інший спектр ферментів глікозилування (таких як, наприклад, глікозилтрансферази та/або глікозидази) порівняно з типом клітин, від якого вони походять. Клітини також можуть бути запрограмовані на експресію інших гетерологічних пептидів або білків, включаючи, наприклад, зрізані форми Фактора VII. В одному варіанті втілення клітинами-хазяями є клітини CHO, запрограмовані на спільну експресію як потрібного поліпептиду Фактора VII (тобто Фактора VII або пов'язаного з Фактором VII поліпептиду), так і іншого гетерологічного пептиду або поліпептиду, такого як, наприклад, модифікований фермент або фрагмент Фактора VII.

Способи одержання композиції Фактора VII, що включає будь-яку зі структур глікоформи, описані вище як (i)-(vi), та способи оптимізації розподілу глікоформи Фактора VII та пов'язаних з Фактором VII поліпептидів здійснюють, застосовуючи етапи:

(а) культивування клітини, яка експресує Фактор VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди за першої групи заданих умов культури;

(б) видобування Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів з культури для одержання композиції, яка включає поліпептиди; і

(в) аналіз структури олігосахаридів, зв'язаних з поліпептидами, для визначення структури глікоформи.

Способи також можуть включати:

(г1) зміна умов культури етапу (а) для досягнення другої групи заданих умов культури;

(д1) повторення етапів (б)-(г1) до досягнення потрібної структури глікоформи;

(е1) контактування Фактор VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів з молекулою полімеру за умов, у яких молекула полімеру є ковалентно зв'язаною з олігосахаридною групою поліпептиду.

В альтернативному варіанті способи також можуть включати:

(г2) хімічну та/або ферментну обробку композиції для зміни структури олігосахаридів; і

(д2) повторення етапів (б)-(г2) до досягнення потрібної структури глікоформи.

Ці способи також можуть включати етап піддавання композицій, які мають задані структури глікоформи принаймні одному випробуванню біоактивності (включаючи, наприклад, коагуляцію, протеоліз Фактора X або TF-зв'язування) або іншої функціональності (наприклад, фармакокінетичного профілю або стійкості) та кореляції конкретних структур глікоформи з конкретними профілями біоактивності або функціональності з метою розпізнання потрібної структури глікоформи.

До змінних умов культури, які можуть бути змінені на етапі (г1), належать, крім інших: клітина походження, наприклад, клітина, яка походить від виду, відмінного від первісно застосованого; або мутантна або рекомбінантна клітина, яка має зміни в одній або кількох глікозилтрансферазах або глікозидазах або інших компонентах матеріалу глікозилування [див. Grabenhorst et al., Glycoconjugate J. 16:81, 1999; Bragonzi et al., Biochem. Biophys. Acta 1474:273, 2000; Weikert, Nature Biotechnol. 17:1116, 1999]; рівень експресії поліпептиду; метаболічні умови, такі як, наприклад, концентрація глюкози або глутаміну; відсутність або присутність сироватки; концентрація вітаміну K; гідролізувати білка, гормони, слідові метали, солі, а також параметри процесу, такі як температура, рівень розчиненого кисню та pH.

Ферментна обробка, яка може бути застосована на етапі (г2) для зміни олігосахаридної структури композиції, включає, крім інших, обробку однією або кількома з сіалідаз (нейрамінідаз), галактозидаз, фукозидаз; галактозилтрансфераз, фукозилтрансфераз та/або сіалілтрансфераз у послідовності й за умов, які дозволяють досягти потрібної зміни у розподілі олігосахаридних ланцюгів, які мають конкретні кінцеві структури. Глікозилтрансферази серійно випускаються компанією Calbiochem (La Jolla, CA), а глікозидази серійно випускаються компанією Glyko, Inc., (Novato, CA).

В одній серії варіантів втілення клітини-хазяї, які експресують Фактор VII або пов'язаний з ним поліпептид, піддають дії певних умов культури, у



яких вони секретують глікозиловані поліпептиди Фактора VII, які мають потрібні олігосахаридні структури, описані вище як будь-які з (i)-(vi). До таких умов культури належать, крім інших, зменшення або повна відсутність сироватки. В оптимальному варіанті клітини-хазяї адаптують до росту за відсутності сироватки і культивують за відсутності сироватки як у фазі росту, так і у фазі вироблення. Такі процедури адаптації описано, наприклад, у [Scharfenberg, et al., *Animal Cell Technology Developments towards the 21<sup>st</sup> Century*, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995 (клітини BHK та CHO); Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11:117-120, 1997 (клітини комарів); Keen, *Cytotechnol.* 17:203-211, 1995 (клітини мієломи); Berg et al., *Biotechniques* 14:972-978, 1993 (клітини нирок людини 293)]. В оптимальному варіанті втілення середовище росту, яке додають до клітин, не містить білка або іншого компонента, виділеного з тваринної тканини або тваринної культури клітин. Див., наприклад, Приклад 1 нижче. Зазвичай, додатково до традиційних компонентів, середовище, придатне для вироблення Фактора VII, містить вітамін К у концентрації 0,1-50мг/л, яка вимагається для  $\gamma$ -карбоксилювання глутамінових залишків у Факторі VII.

В іншій серії варіантів втілення глікоформи виробляють шляхом піддавання композиції Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів ферментній та/або хімічній модифікації N-зв'язаних та/або O-зв'язаних олігосахаридів, які в них містяться, наприклад, піддавання композиції модифікації сіалілтрансферазою або галактозилтрансферазою, як описано, наприклад, у US 6,399,336. В оптимальному варіанті модифікують N-зв'язані олігосахариди. Сіалілтрансфераза здатна сіалілювати високий відсоток акцепторних груп (наприклад, кінцевої галактози) на глікопротеїні. Потрібного результату зазвичай досягають, застосовуючи приблизно 50 mU сіалілтрансферази на мг глікопротеїну або менше. Зазвичай олігосахаридні ланцюги на глікопротеїні, які мають змінений таким способом структуру глікоформи, в результаті мають більший відсоток сіалілованих кінцевих галактозних залишків, ніж необробленого поліпептиду. Практично 100% кінцевих галактозних залишків можуть бути сіалілованими після застосування цих способів. Ці способи зазвичай дозволяють досягти потрібного рівня сіалілювання за приблизно 48 годин або менше. В оптимальному варіанті для глікозилювання N-зв'язаних вуглеводів глікопротеїнів сіалілтрансфераза має бути здатною переносити сіалову кислоту до послідовності Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-, найбільш поширеної передостанньої послідовності, яка лежить в основі кінцевої сіалової кислоти на повністю сіалілованих вуглеводних структурах. Прикладами сіалілтрансфераз, у яких використовується Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc- як акцепторна група, є ST3Gal III, ST3Gal IV та ST3Gal V (приєднання NeuAc за допомогою зв'язку  $\alpha$ 2-3) і ST6Gal I та ST6Gal II (приєднання NeuAc за допомогою зв'язку  $\alpha$ 2-6) (див. US 6,399,336). [Перелік сіалілтрансфераз описано в публікації Tsuji et al., *Glycobiology* 6:v-xiv (1996)].

Таким чином, суміш двох ферментів може мати велике значення, якщо у кінцевому продукті

потрібні обидва зв'язки. Тобто, сіалілювання глікопротеїну здійснюють, застосовуючи, наприклад, сіалілтрансферазний цикл, який включає синтетазу CMP-сіалової кислоти. Система CMP-регенерації у цьому циклі включає цитидинмонофосфат (CMP), нуклеозидний трифосфат, фосфатний донор, кіназу, здатну переносити фосфат від фосфатного донора до нуклеозидних дифосфатів, та кіназу нуклеозидного монофосфату, здатну переносити кінцевий фосфат від нуклеозидного трифосфату до CMP. У регенеруючій системі також бере участь синтетаза CMP-сіалової кислоти, яка переносить сіалову кислоту до CMP. У циклі сіалілювання, CMP перетворюють на CDP за допомогою кінази нуклеозидного монофосфату в присутності доданого ATP. ATP каталітично виробляється з його побічного продукту, ADP, піруваткіназою (PK) у присутності доданого фосфоенолпірувату (PEP). CDP далі перетворюють на CTP, і це перетворення каталізується PK у присутності PEP. CTP реагує з сіаловою кислотою для утворення неорганічного пірофосфату (PPi) та CMP-сіалової кислоти, і остання реакція каталізується синтетазою CMP-сіалової кислоти. Після сіалілювання галактозилглюкозиду вивільнений CMP знову надходить до регенеруючої системи для утворення CDP, CTP та CMP-сіалової кислоти. Утворений PPi очищується і утворює неорганічний фосфат як побічний продукт. Піруват також є побічним продуктом. Через ізолюваний і циклічний характер способу, за наявності всіх реагентів та ферментів реакція триває, доки не витратиться перший із субстратів (наприклад, вільний NeuAc та PEP або акцептор). Сіалілтрансферазні цикли описано наприклад, у US 5,374,541 та US 6,399,336.

Акцептори для сіалілтрансферази мають бути присутніми на глікопротеїні, який підлягає модифікації. Прийнятими акцепторами є, наприклад, Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-, Gal( $\beta$ 1-4)GalNAc-, Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-, Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc-, Gal( $\beta$ 1-6)GlcNAc-, Gal( $\beta$ 1-4)Glc- та інші акцептори, відомі спеціалістам [див., наприклад, Paulson et al. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 5617-5624]. Зазвичай олігосахаридні ланцюги включають рецептори, які приєднуються до аспарагінових, серинових або треонінових залишків, присутніх у поліпептиді.

Глікопротеїн може бути "підрізаний", повністю або частково, для відкриття або акцептора для сіалілтрансферази, компонента, до якого можуть додаватися один або кілька відповідних залишків, для одержання відповідного акцептора. Ферменти, наприклад, глікозилтрансферази та ендоглікозидази, застосовують для реакцій приєднання та підрізання. Наприклад, глікопротеїн може бути "підрізаний" шляхом його обробки сіалідазою для створення кінцевих галактозних груп перед піддаванням білка сіалілтрансферазному циклові, або навіть далі до рівня N-ацетилглюкозаміну шляхом подальшої обробки галактозидазами. Див., наприклад, Патент США №5,272,066, у якому описано способи одержання поліпептидів, які мають придатні акцептори для сіалілювання.

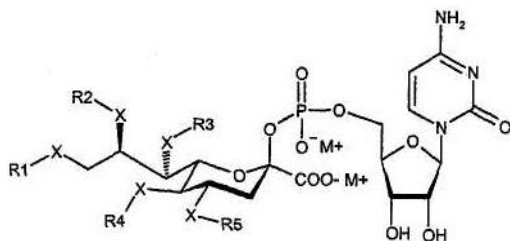
Способи ковалентного зв'язування молекул полімерів з поліпептидами Фактора VII:

Різні хімічні компоненти, наприклад, молекули полімерів, які застосовують при здійсненні даного винаходу, можуть бути ковалентно зв'язані з олігосахаридами на поліпептиді Фактора VII або шляхом хімічного синтезу, або шляхом ферментної обробки поліпептиду, наприклад, модифікованою сіаловою кислотою. Молекула полімеру також може бути з'єднана з олігосахаридом через лінкер. Придатні лінкери є загальновідомими серед спеціалістів. Прикладами є, крім інших, N-(4-ацетилфеніл)малімід, активовані сукцимідиловим естером малімідо-похідні, наприклад, серійного виробництва сукцимідил 4-малімідобутаноат, 1,6-бісмалімідогексани.

Різні хімічні компоненти, наприклад, молекули полімерів, які застосовують при здійсненні даного винаходу, можуть бути ковалентно зв'язані з сіаловою кислотою, і таким чином "модифікована" (або кон'югована) сіалова кислота після цього включається у сіалілтрансферазний цикл, в результаті чого утворюється молекула полімеру, ковалентно зв'язаного з глікопротеїном. Кон'юговану сіалову кислоту одержують традиційними способами, відомими спеціалістам у даній галузі. Молекула полімеру також може бути з'єднана з сіаловою кислотою через лінкер.

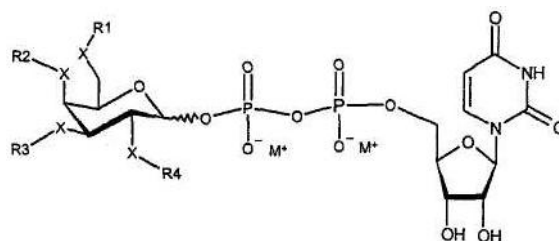
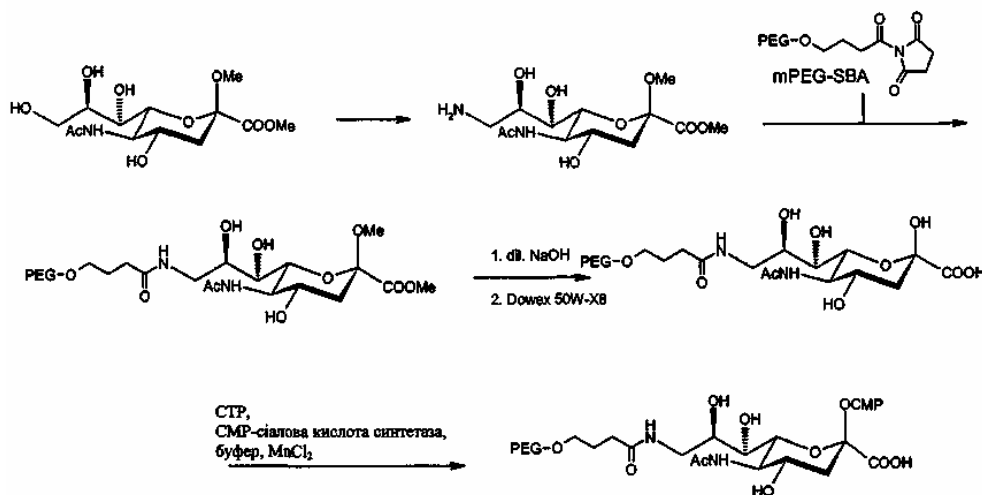
Хемоферментативна дериватизація аналогів FVII та FVII

Фосфонуклеотиди модифікованих цукрів, які застосовують при практичному втіленні даного винаходу, можуть бути заміщені згідно з загальною формулою I та II:



Загальна формула I

Схема 1:



Загальна формула II

де

- X є членами, незалежно вибраними з-поміж S, O, NH, або валентним зв'язком;

- R1, R2, R3, R4 та R5 є членами, незалежно вибраними з-поміж H, молекулою полімеру та лінкера, ковалентно зв'язаною з полімером, ацилом (включаючи ацетил та гідроксиацетил) та алкілом;

- M+ є катіоном, вибраним з-поміж Na+, K+, Li+, тетрабутиламонієм або іншим подібним катіоном.

В оптимальному варіанті втілення R1 та R2 незалежно є полімером на основі ПЕГ з масою 1-40000кДа.

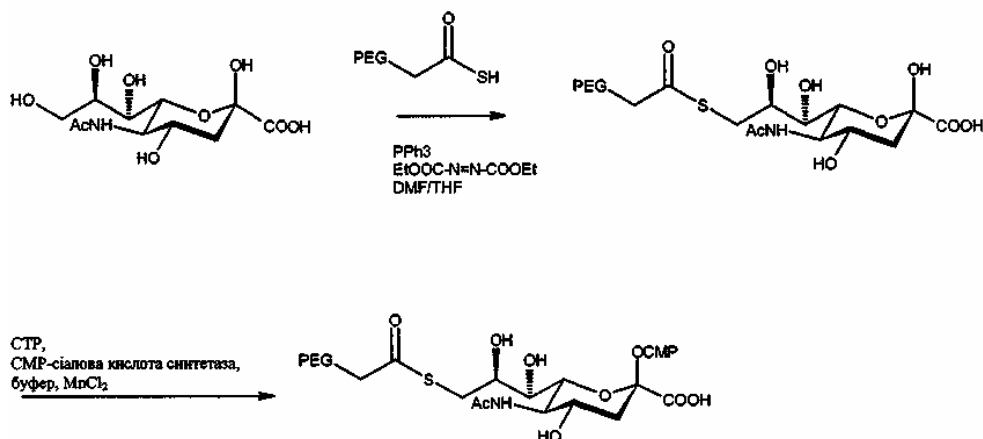
У ще кращому варіанті втілення R1 незалежно є полімером на основі ПЕГ з масою 1-40000кДа.

У прикладі варіанта втілення, представленому на Схемі 1, амін-, 2-гідрокси- та карбоксил- захищену нейрамінову кислоту спочатку перетворюють на її 9-аміно-похідну згідно з [Isecke, R.; Brossmer, R., Tetrahedron 1994, 50(25), 7445-7460], яку далі дериватизують за допомогою ПЕГ-COOH, застосовуючи стандартні умови з'єднання. ПЕГ-дериватизований продукт після цього піддають депротекції у м'яких кислотних умовах і ферментативно перетворюють на відповідний нуклеотидний цукор.

В іншому прикладі варіанта втілення, представленому на Схемі 2, N-ацетилнейрамінову кислоту обробляють ПЕГ - дериватизованими тіокислота-

ми в умовах Міцунобу для одержання ПЕГ-дериватизованої N-ацетилнейрамінової кислоти, яку потім перетворюють на цукровий нуклеотид.

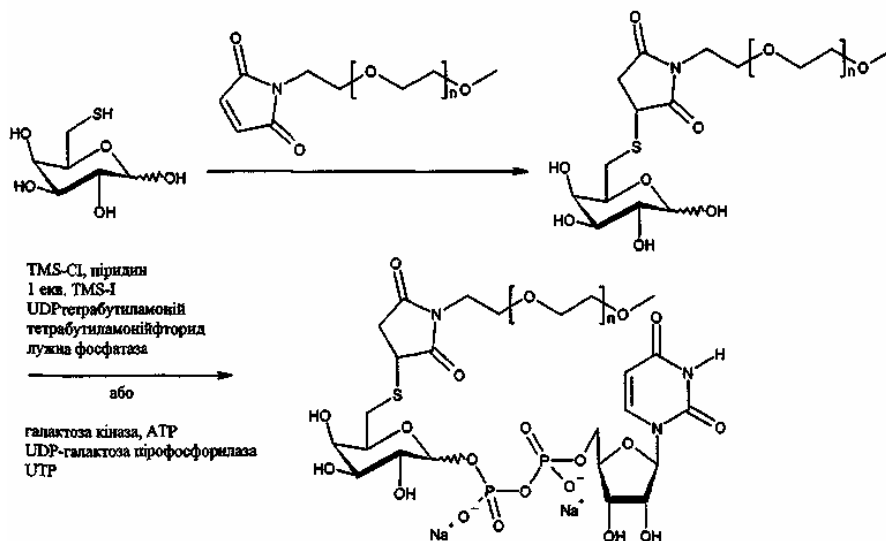
**Схема 2:**



У прикладі варіанта втілення, представленому на Схемі 3, тиол модифікованої галактози реагує з ПЕГ, що містить малеїмідний компонент. ПЕГ-

галактозну сполуку після цього перетворюють на відповідний нуклеотидний цукор ферментними або хімічними способами.

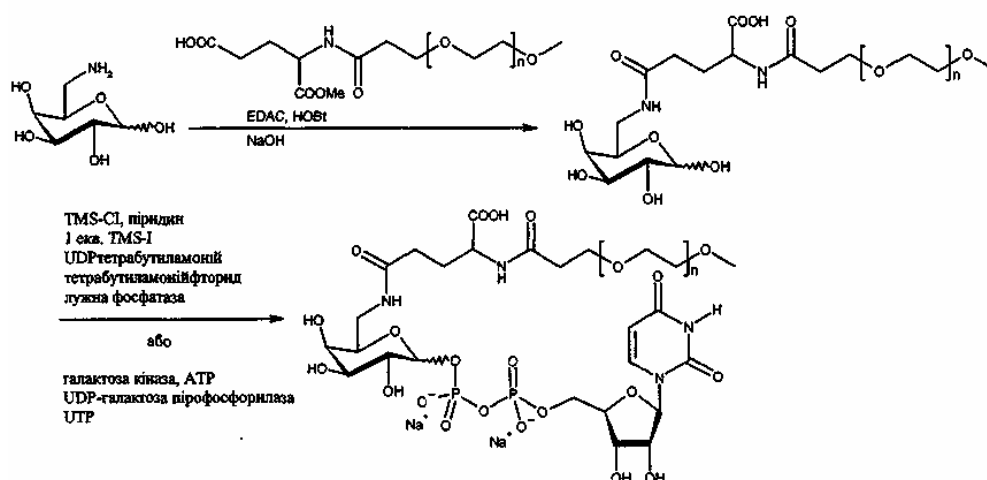
**Схема 3**



В іншому прикладі варіанта втілення представленому на Схемі 4, 6-аміно галактоза [Fernandez, J. et al., J. Org. Chem. 1993, 58(19), 5192-5199] реагує з ПЕГ, що містить захищений амінокислотний

компонент. Метилловий естер омилюють. ПЕГ-галактозну сполуку після цього перетворюють на відповідний нуклеотидний цукор ферментними або хімічними способами.

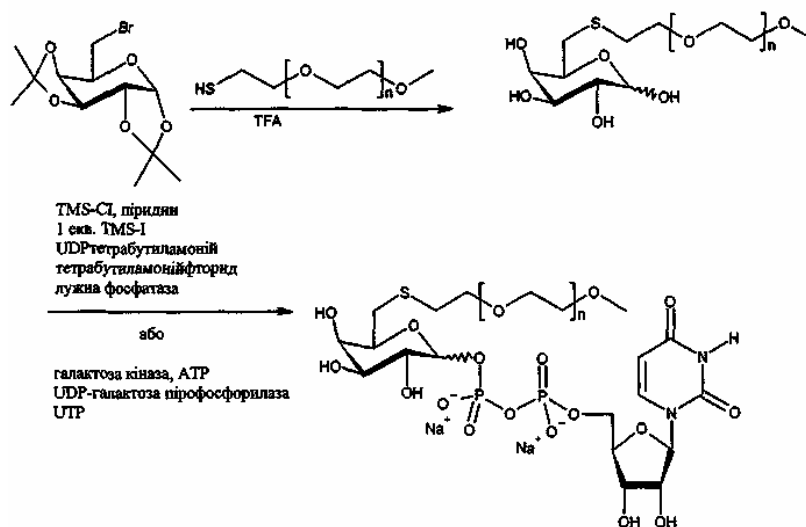
Схема 4



В іншому прикладі варіанта втілення представлено на Схемі 5, захищена 6-бromo-галактоза [Hodosi, G., Podanyi, B. and Kuzsmann, J., Carbohydr. Res., 1992, 230(2), 327-342] реагує з ПЕГ, що містить тіольний компонент. Ізопропіліде-

нові групи видаляють у кислотних умовах. ПЕГ-галактозну сполуку після цього перетворюють на відповідний нуклеотидний цукор ферментними або хімічними способами.

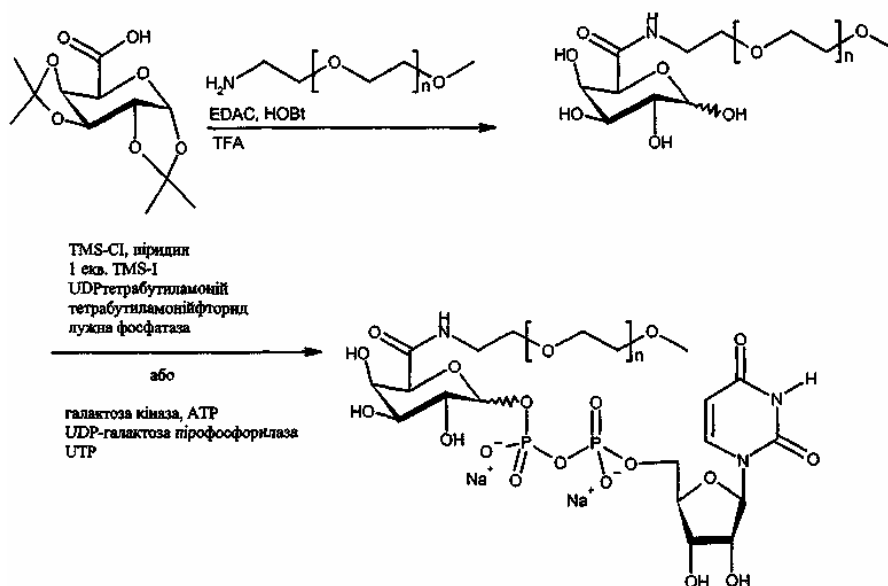
Схема 5



В іншому прикладі варіанта втілення представлено на Схемі 6, захищена галактуронова кислота [Godage, Y.S. and Fairbanks, A.J., Tetrahedron Lett, 2000, 41(39), 7589-7594] реагує з ПЕГ, що містить амінний компонент. Ізопропіліденові групи

видаляють у кислотних умовах. ПЕГ-галактозну сполуку після цього перетворюють на відповідний нуклеотидний цукор ферментними або хімічними способами.

Схема 6



В цілому цукрові нуклеотиди, наприклад, описані вище, можуть бути ферментативно перетворені на відповідні глікопротеїни, наприклад, пов'язаний з FVII або FVII поліпептид із застосуванням природних або мutowаних глікозилтрансфераз, до яких, крім інших, належать:  $\alpha$ 2,3-сіалілтрансферази,  $\alpha$ 2,6-сіалілтрансферази або  $\beta$ 1,4-галактозилтрансферази. Залежно від вибору ПЕГ - дериватизованого цукрового нуклеотиду (CMP-SA-ПЕГ або UDP-Gal-ПЕГ), бажаною може бути обробка пов'язаного з FVII поліпептиду сіалідазою, галактозидазою, або і тією, й іншою, перед реакцією з глікозилтрансферазами та ПЕГ - дериватизованим цукровим нуклеотидом.

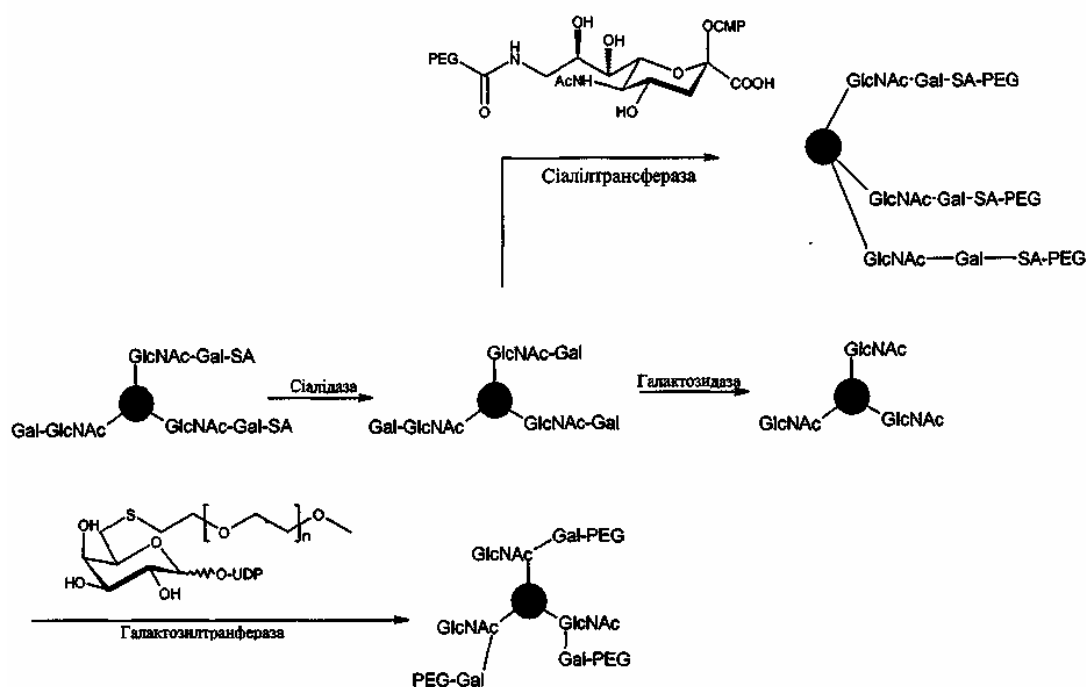
Таким чином, в одному з оптимальних варіантів втілення аналог FVII обробляють сіалідазою для одержання аналога асіало-FVII, який згодом обробляють сіалілтрансферазою та аналогом CMP-SA-ПЕГ згідно з загальною формулою I для одержання ПЕГ - дериватизованого аналога FVII.

В іншому варіанті втілення пов'язаний з FVII поліпептид послідовно обробляють спочатку сіалідазою, а потім галактозидазою для одержання пов'язаного з асіало галакто FVII поліпептиду. Цей аналог після цього обробляють галактозил-

рансферазою та аналогом UDP-Gal-ПЕГ згідно з загальною формулою II для одержання ПЕГ - дериватизованого аналога FVII.

У серії варіантів втілення застосовують модифіковані галактозні сполуки, які є ковалентно зв'язаними з полімером або безпосередньо, або з застосуванням лінкера. Можна або застосувати Фактор VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди безпосередньо для одержання нижчого рівня полімеру на поліпептид, або спочатку обробити Фактор VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди сіалідазою для видалення кінцевих сіалових кислот з метою одержання вищого рівня полімеру на пептид. Шляхом обробки поліпептиду галактозидазою отримують точки приєднання для модифікованих галактозних сполук. Зв'язок між модифікованими галактозними сполуками та обробленим поліпептидом утворюють шляхом застосування UDP-активованої форми модифікованих галактозних сполук та галактозилтрансферази. Приклад варіанта втілення цього типу показано на Схемі 7, на якій чорне коло представляє Фактор VII або пов'язані з Фактором VII поліпептиди, і показано кінцеву частину кількох із вуглеводів.

Схема 7



Хімічна дериватизація FVII та аналогів FVII

Хімічне окиснення вуглеводних залишків із застосуванням періодату натрію є альтернативним способом одержання кон'югатів FVII - ПЕГ. Хімічне окиснення вуглеводу зазвичай утворює багато реактивних альдегідних груп, кожна з яких здатна реагувати з ПЕГ-нуклеофілами, наприклад, ПЕГ-гідразидом, ПЕГ-О-гідроксиламіном та ПЕГ-аміном.

З ПЕГ-гідразидом та ПЕГ-О-гідроксиламіном одержують, відповідно, стійкі кон'югати FVII-ПЕГ-ацилгідрозон та FVII-ПЕГ-оксим. З ПЕГ-амінами утворюються менш стійкий кон'югат основи Шиффа. Однак цей кон'югат може бути додатково стабілізований шляхом відновлення ціаноборогідридом натрію, і при цьому утворюється вторинний аміний зв'язок. Кон'югати FVII-ПЕГ-ацилгідрозону також можуть бути відновлені ціаноборогідридом натрію, і при цьому утворюються N,N'-зв'язані гідразинові кон'югати.

Очищення композицій гліко-кон'югованого Фактора VII

Вжитий авторами термін "композиція Фактора VII" стосується певної кількості поліпептидів Фактора VII, поліпептидів Фактора VIIa або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, включаючи варіанти та хімічно модифіковані форми, які було відокремлено від клітини або реакційного середовища, в якому їх було синтезовано.

Очищення композицій та кон'югатів Фактора VII:

Відокремлення одержаних рекомбінантним шляхом поліпептидів з клітин їх походження досягають будь-яким способом, відомим спеціалістам у даній галузі, включаючи, крім інших, відокремлення середовища культури клітин, що містить потрібний продукт, від культури прилипаючих клітин;

центрифугування або фільтрацію для видалення неприлипаючих клітин та інші.

Поліпептиди Фактора VII необов'язково можуть бути піддані подальшому очищенню. Очищення досягають, застосовуючи будь-який спосіб, відомий спеціалістам у даній галузі, включаючи, крім інших, афінну хроматографію, наприклад, на колонці з антитілом проти Фактора VII [див., наприклад, Wakabayashi et al., J. Biol. Chem. 261:11097, 1986; та Thim et al., Biochem. 27:7785, 1988]; хроматографію з гідрофобною взаємодією; іонообмінну хроматографію; хроматографію з виключенням за розміром; електрофоретичні процедури (наприклад, препаративне ізоелектрофокусування (IEF), диференціальну розчинність (наприклад, осадження сульфатом амонію) або екстрагування та інші. У загальних рисах їх описано у [Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York, 1982; та Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, видавці VCH Publishers, New York, 1989]. Після очищення композиція в оптимальному варіанті містить менше, ніж приблизно 10% за масою, ще краще - менше, ніж приблизно 5%, і найкраще - менше, ніж приблизно 1% білків, які не належать до Фактора VII, одержаних із клітини-хазяїна.

Фактор VII та пов'язані з Фактором VII поліпептиди можуть бути активовані шляхом протеолітичного розщеплення з застосуванням Фактора XIIa або інших протеаз, які мають трипсиноподібну специфічність, наприклад, Фактора IXa, калікреїну, Фактора Xa та тромбіну. [Див., наприклад, Osterud et al., Biochem. 11:2853 (1972); Thomas, Патент США №4,456,591; та Hedner et al., J. Clin. Invest. 71:1836 (1983)]. В альтернативному варіанті Фактор VII активують шляхом його пропускання через колонку для іонообмінної хроматографії, напри-

клад, Mono Q® (Pharmacia) або іншу подібну колодку. Одержаний в результаті активований Фактор VII рецептують і вводять, як описано нижче.

Функціональні властивості композицій Фактора VII

Композиції поліпептидів Фактора VII та пов'язаних з Фактором VII поліпептидів, які мають задані олігосахаридні структури з ковалентно зв'язаними молекулами полімерів згідно з винаходом мають поліпшені функціональні властивості порівняно з контрольними композиціями. До поліпшених функціональних властивостей, крім інших, можуть належати а) фізичні властивості, наприклад, стійкість при зберіганні; б) фармакокінетичні властивості, наприклад, біодоступність та півперіод; і в) імуногенність у людському організмі.

Контрольна композиція є композицією, яка включає поліпептид, який має амінокислотну послідовність, ідентичну тій, що міститься у композиції згідно з винаходом, з якою її порівнюють (прикладом можуть бути некон'юговані форми Фактора VII дикого типу або конкретний варіант або хімічно модифікована форма), але не є кон'югованою з будь-якою(ими) молекулою(ами) полімер(ів), що міститься (містяться) у композиції згідно з винаходом. Наприклад, контрольні композиції зазвичай включають некон'югований Фактор VII дикого типу або некон'юговані пов'язані з Фактором VII поліпептиди.

Стійкість при зберіганні композиції Фактора VII визначають шляхом вимірювання (а) часу, який вимагається для 20% послаблення біоактивності композиції при зберіганні у вигляді сухого порошку при 25°C та/або (б) часу, який вимагається для подвоєння пропорції агрегатів Фактора VIIa у композиції.

У деяких варіантах втілення композиції згідно з винаходом виявляють збільшення принаймні приблизно на 30%, краще - принаймні приблизно на 60%, ще краще - принаймні приблизно на 100%, часу, який вимагається для 20% послаблення біоактивності порівняно з часом, який вимагається для такого самого явища у контрольній композиції, коли обидві композиції зберігаються у вигляді сухого порошку при 25°C. Вимірювання біоактивності здійснюють, застосовуючи аналіз коагуляції, аналіз протеолізу, аналіз TF-зв'язування або аналіз TF-незалежного вироблення тромбіну.

У деяких варіантах втілення композиції згідно з винаходом виявляють збільшення принаймні приблизно на 30%, краще - принаймні приблизно на 60%, ще краще - принаймні приблизно 100%, часу, який вимагається для подвоєння агрегатів порівняно з контрольною композицією, коли обидві композиції зберігаються у вигляді сухого порошку при 25°C. Вміст агрегатів визначають шляхом HPLC з проникненням гелю на колонці Protein Pak 300 SW (7,5x300мм) (Waters, 80013) так, як описано далі. Колонку врівноважують елюентом А (0,2М сульфату амонію, 5% ізопропанолу, рН доводять до 2,5 фосфорною кислотою, а потім рН доводять до 7,0 триетиламіном), після чого 25мкг зразка подають на колонку. Елюювання з Елюентом А зі швидкістю потоку 0,5мл/хв протягом 30хв та виявлення досягають шляхом вимірювання оптичної густини при 215нм. Вміст агрегатів розраховують як площу під

піком агрегатів Фактора VII/загальну площу піків Фактора VII (мономер та агрегати).

"Біодоступність" стосується пропорції введеної дози Фактора VII або пов'язаної з Фактором VII композиції, яка може бути визначена у плазмі у заданий час після введення. Зазвичай біодоступність вимірюють у піддослідних тварин шляхом введення дози приблизно 25-250мкг/кг композиції; отримання зразків плазми у заданий час після введення; та визначення вмісту Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів у зразках із застосуванням одного або кількох аналізів коагуляції (або будь-якого біоаналізу), імунологічного аналізу, або іншого рівноцінного аналізу. Дані зазвичай відображають графічно як залежність [Фактора VII] від часу і біодоступність виражають як площу під кривою (AUC). Відносна біодоступність випробуваної композиції стосується співвідношення між AUC випробуваної композиції та AUC контрольної композиції.

У деяких варіантах втілення композиції згідно з даним винаходом виявляють відносну біодоступність, яка становить принаймні приблизно 110%, краще - принаймні приблизно 120%, ще краще - принаймні приблизно 130%, і найкраще - принаймні приблизно 140% біодоступності контрольної композиції. Біодоступність вимірюють у будь-якого виду ссавців, в оптимальному варіанті - у собак, і заданий час, який беруть для розрахунку AUC, може включати різні інкременти від 10хв до 8год.

"Півперіод" стосується часу, який вимагається для зменшення концентрації у плазмі поліпептидів Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів з певного значення до половини цього значення. Півперіод визначають, застосовуючи таку саму процедуру, як для біодоступності. У деяких варіантах втілення композиції згідно з даним винаходом мають збільшення півперіоду принаймні приблизно 0,25год, краще - принаймні приблизно 0,5год, ще краще - принаймні приблизно 1год, і найкраще - принаймні приблизно 2год відносно півперіоду контрольної композиції.

"Імуногенність" композиції стосується здатності композиції, при введенні людині, викликати шкідливу імунну реакцію, гуморальну, клітинну, або і ту, й іншу. Поліпептиди Фактора VIIa та пов'язані з Фактором VIIa поліпептиди не викликають помітної імунної реакції у людини. Незважаючи на це, у будь-якій людській субпопуляції можуть існувати особи, які виявляють чутливість до певних введених білків. Імуногенність вимірюють шляхом кількісного визначення присутності антитіл проти Фактора VII та/або чутливих до Фактора VII Т-клітин у чутливої особи, застосовуючи традиційні способи відомі спеціалістам у даній галузі. У деяких варіантах втілення композиції згідно з даним винаходом виявляють зниження імуногенності у чутливої особи, яке становить принаймні приблизно 10%, краще - принаймні приблизно 25%, ще краще - принаймні приблизно 40%, і найкраще - принаймні приблизно 50% відносно імуногенності контрольної композиції у цієї особи.

Фармацевтичні композиції

Композиції згідно з даним винаходом застосовують для лікування від будь-якого чутливого до Фактора VII синдрому, наприклад, порушень кро-

вотечі, включаючи, крім інших, викликані дефіцитом фактора коагуляції (наприклад, гемофілію А та В або дефіцит факторів коагуляції XI або VII); тромбоцитопенією або хворобою фон Віллебранда, або інгібіторами коагулюючого фактора, або надмірною кровотечею з будь-якої причини. Композиції також можуть вводитись пацієнтам у зв'язку з хірургічною операцією або іншою травмою або пацієнтам, які отримують антикоагулянтну терапію.

Композиції, які включають пов'язані з Фактором VII поліпептиди згідно з винаходом, що мають значно знижену біоактивність відносно Фактора VII дикого типу, можуть застосовуватись як антикоагулянти, наприклад, для пацієнтів, яких піддають ангіопластиці або іншим хірургічним процедурам, які можуть збільшити ризик тромбозу або закупорювання кровоносних судин, як це трапляється, наприклад, при рестенозі. Іншими медичними показаннями, при яких рекомендуються антикоагулянти, є, крім інших, тромбоз глибокої вени, легенева емболія, інсульт, дисемінована внутрішньосудинна коагуляція (DIC), відкладення фібрину в легенях та нирках у зв'язку з грам-негативною ендотоксемією, інфаркт міокарда; синдром гострої дихальної недостатності (ARDS), синдром системної запальної реакції (SIRS), гемолітико-уремічний синдром (HUS), MOF та TTP.

Фармацевтичні композиції, які включають Фактор VII та пов'язані з Фактором VII композиції згідно з даним винаходом, призначаються, насамперед, для парентерального введення з метою профілактичного та/або терапевтичного лікування. В оптимальному варіанті фармацевтичні композиції вводять парентерально, тобто внутрішньовенно, підшкірно або внутрішньом'язово. Вони можуть вводитись шляхом безперервного або пульсуючого вливання.

Фармацевтичні композиції або препарати включають композицію згідно з винаходом у комбінації, в оптимальному варіанті - є розчинними у фармацевтично прийнятному носії, в оптимальному варіанті - водному носії або розріджувачі. Застосовують різні водні носії, наприклад, воду, буферовану воду, 0,4% розсіл, 0,3% гліцин та інші. Композиції згідно з винаходом також можуть бути рецептовані у ліпосомні композиції для доставлення або спрямування у місця ушкодження. Ліпосомні композиції в загальних рисах описано, наприклад, у патентах США №№ 4,837,028, 4,501,728 та 4,975,282. Композиції можуть бути стерилізовані традиційними, загальновідомими способами стерилізації. Одержані в результаті водні розчини розфасовують для застосування або фільтрують в асептичних умовах і ліофілізують, і ліофілізовані композиції перед введенням комбінують зі стерильним водним розчином.

Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні додаткові речовини або ад'юванти, включаючи, крім інших, агенти, які регулюють рН, та буферуючі агенти та/або агенти, які регулюють тонус, наприклад, ацетат натрію, лактат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію та інші.

Концентрація Фактора VII або пов'язаних з Фактором VII поліпептидів у цих композиціях може

бути різною в широких межах, тобто від меншої, ніж приблизно 0,5% за масою, зазвичай від принаймні приблизно 1% за масою до 15 або 20% за масою, і її вибирають, насамперед, за об'ємом рідини, в'язкістю, і т. ін., згідно з конкретним вибраним режимом введення.

Таким чином, типова фармацевтична композиція для внутрішньовенного вливання може складатися з 250мл стерильного розчину Рінгера та 10мг композиції. Існуючі способи одержання композицій для парентерального введення є відомими або зрозумілими спеціалістам у даній галузі, і їх детальніше описано, наприклад, у [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)].

Композиції, які містять композиції згідно з даним винаходом, вводять для профілактичного та/або терапевтичного лікування. При терапевтичному застосуванні композиції вводять суб'єктові, який уже страждає від хвороби, як описано вище, у кількості, достатній для лікування, послаблення або часткового призупинення хвороби та її ускладнень. Кількість, достатня для цього, визначається як "терапевтично ефективна кількість". Ефективна кількість у будь-якому разі залежить від тяжкості хвороби або ушкодження, а також маси та загального стану суб'єкта. Однак в цілому ефективна кількість становить від приблизно 0,05мг до приблизно 500мг композиції на день для 70-кілограмового суб'єкта, причому найчастіше застосовують дози від приблизно 1,0мг до приблизно 200мг композиції на день. Слід розуміти, що визначення відповідної дози може бути досягнуто з застосуванням загальноприйнятих експериментів, шляхом побудови матриці значень та випробування різних точок у цій матриці.

Місцеве доставлення композиції згідно з даним винаходом, наприклад, місцеве нанесення, здійснюють, наприклад, за допомогою аерозолі, перфузії, подвійних балонних катетерів, стента, її включають у судинні трансплантати або стенти, застосовують гідрогелі для вкривання балонних катетерів, або іншими традиційними способами. У будь-якому разі фармацевтичні композиції мають забезпечувати кількість композиції, достатню для ефективного лікування суб'єкта.

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом також можуть включати інші біологічно активні агенти, наприклад, не пов'язані з Фактором VII коагулянти або антикоагулянти.

Композиції уповільненого вивільнення

Прикладами композицій уповільненого вивільнення є напівпроникні матрикси з твердих гідрофобних полімерів, які містять поліпептид або кон'югат, причому матрикси мають придатну форму, наприклад, плівки або мікрокапсул. Прикладами матриксів уповільненого вивільнення є поліестери, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетил-метакрилат) або полівініловий спирт), полілактиди, співполімери L-глутамінової кислоти та етил-L-глутамату, нерозкладний етиленвінілацетат, розкладні співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, наприклад, одержані за технологією ProLease® або Lupron Depot® (мікросфери для ін'єкцій, які складаються зі співполімеру молочної кислоти-гліколевої кислоти та лейпролід ацетату),



та полі-D(-)-3-гідроксимасляна кислота. Хоча полімери, наприклад, етиленвінілацетат та молочна кислота-гліколева кислота забезпечують вивільнення молекул протягом тривалого періоду, наприклад, до 100 днів або більше, деякі гідрогелі вивільнюють білки протягом коротших періодів часу. Коли інкапсульовані поліпептиди залишаються в організмі протягом тривалого періоду часу, вони можуть денатурувати або агрегувати в результаті дії вологи при 37°C, що призводить до втрати біологічної активності та можливих змін імуногенності. Можуть бути розроблені раціональні методики для стабілізації залежно від задіяного механізму. Наприклад, якщо виявлено, що механізмом агрегації є утворення міжмолекулярного зв'язку S-S через тіо-дисульфідний взаємний обмін, стабілізація може бути досягнута шляхом модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізації з кислотних розчинів, контролювання вологовмісту, застосування відповідних додатків та розробки спеціальних композицій полімерних матриксів.

Представлені нижче необмежувальні приклади пояснюють деякі аспекти винаходу.

#### Приклади

##### Приклад 1

ГлікоПЕГілювання продукту з високим сіаловим вмістом

Поліетиленгліколь-CMP-сіалову кислоту (ПЕГ-CMPSA) одержують шляхом ковалентного зв'язування ПЕГ з молекулярною масою 10000Да з сіаловою кислотою.

Фактор VIIa з 87-99% вмістом сіалової кислоти обробляють сіалідазою, наприклад, як описано у патенті США №5,272,066, і повторно сіалілюють сіалілтрансферазою, застосовуючи ПЕГ-CMPSA як донорну молекулу (наприклад, як описано у патенті США №6,399,336). Після того, як реакція ПЕГілювання досягає свого максимального включення, до реакційної суміші додають CMPSA для захисту будь-якої відкритої кінцевої галактози.

Включення ПЕГілюваної сіалової кислоти аналізують шляхом SDS-PAGE, CE-PAGE, ізоелектрофокусування у гелях та CE-IEF.

Включають 94-100% сіалову кислоту; включають у середньому 1-4 ПЕГ-групи.

##### Приклад 2

ГлікоПЕГілювання продукту з середнім сіаловим вмістом

Поліетиленгліколь-CMP сіалову кислоту (ПЕГ-CMPSA) одержують шляхом ковалентного зв'язування ПЕГ з молекулярною масою 10000Да з сіаловою кислотою.

Фактор VIIa з 87-93% вмістом сіалової кислоти обробляють сіалілтрансферазою, застосовуючи ПЕГ-CMPSA як донорну молекулу (наприклад, як описано у патенті США №6,399,336). Після того, як реакція ПЕГілювання досягає свого максимального включення, до реакційної суміші додають CMPSA для захисту будь-якої відкритої кінцевої галактози.

Включення ПЕГілюваної сіалової кислоти аналізують шляхом SDS-PAGE, CE-PAGE, ізоелектрофокусування у гелях та CE-IEF.

Включають 87-100% сіалову кислоту; включають у середньому 0,1-0,5 ПЕГ групи.

##### Приклад 3

ПЕПльовану похідну цитидин 5'-монофосфосіалової кислоти (CMP-SA-ПЕГ): метиловий естер N-Ацетил-O<sup>2</sup>-метил-9-аміно-9-дезоксинеїрамінової кислоти (10мг, 0,031ммоль, одержаний згідно з [Isecke, R.; Brossmer, R., Tetrahedron 1994, 50(25), 7445-7460]) розчиняють у воді (2мл) і додають mPEG-SBA (170мг, 0,03ммоль, 5кДа, Shearwater 2M450H01). Суміш перемішують при навколишній температурі до завершення згідно з TLC. Розчинник видаляють шляхом ліофілізації і залишок повторно розчиняють у суміші 1:1 метанолу та розчину 0,1M NaOH (5мл). Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 1год, потім пропускають через колонку зі смолою Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>) при 4°C і ліофілізують. Залишок після цього повторно розчиняють у воді (5мл), додають смолу Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>) і суміш перемішують до завершення згідно з TLC.

Цитидин 5'-монофосфо-аналоги похідних сіалової кислоти загальної формули I в цілому одержують згідно з [E.S.Simon, M.D.Bednarski and G.M.Whitesides, J.Am.Chem.Soc, 1998, 110,7159-7163], як описано далі: синтез цитидин 5'-монофосфонеїрамінової кислоти розчиняють у розчині 9-ПЕГілюваної N-ацетил-9-аміно-9-дезоксинеїрамінової кислоти (одержаний, як описано вище) і додають до розчину СТР. Суміш доводять до pH 8,5 і додають MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі й додають 1N NaOH через перистальтичний насос для підтримання pH близько 8,5. Коли <sup>1</sup>H-ЯМР на аліквотній кількості показує завершення, продукт виділяють шляхом стандартної іонообмінної хроматографії.

##### Приклад 4

FVIIa (1мг), розчинений у 1мл 0,1M ацетату натрію, pH 5,5, окиснюють до рівня його гліканив при кімнатній температурі протягом 30хв за допомогою 10мМ періодату натрію. Розчин після цього діалізують із 100мМ ацетату натрію, pH 5,5. Після діалізу ПЕГ-C(O)-NHNH<sub>2</sub> (одержаний шляхом гідразінолізу mPEG-SBA (2мг, 5кДа, Shearwater 2M450H01)) змішують з окисненим FVIIa і залишають для реакції до наступного дня при кімнатній температурі з легким збовтуванням. Одержаний таким чином розчин кон'югату FVIIa-ПЕГ діалізують (мембрани для діалізу 10кДа) із 100мМ буфера Tris-HCl, pH 7,5 і зберігають при 4°C.

##### Фармакологічні способи

Представлені нижче аналізи застосовують для визначення біологічної активності, півперіоду та біодоступності Фактора VII та пов'язаних з Фактором VII поліпептидів.

##### Аналіз (I)

##### In Vitro аналіз гідролізу

Представлений нижче спосіб застосовують для визначення біоактивності Фактора VIIa. Аналіз здійснюють у мікротитрувальному планшеті (MaxiSorp, Nunc, Denmark). Хромогенний субстрат D-Ile-Pro-Arg-p-нітроанілід (S-2288, Chromogenix, Sweden) у кінцевій концентрації 1мМ додають до фактора VIIa (кінцева концентрація 100нМ) у 50мМ Hepes, pH 7,4, що містить 0,1M NaCl, 5мМ CaCl<sub>2</sub> та 1мг/мл альбуміну сироватки великої рогатої худоби. Оптичну густину при 405нм вимірюють безперервно у зчитувальному пристрої для планшетів

SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). Оптичну густину, отриману під час 20-хвилинної інкубації, після віднімання оптичної густини у порожній лунці, яка не містила ферменту, використовують для розрахунку співвідношення між активністю випробуваного та контрольного Фактора VIIa.

#### Аналіз (II)

##### In Vitro аналіз протеолізу

Представлений нижче спосіб застосовують для визначення біоактивності Фактора VIIa. Цей аналіз здійснюють у мікротитрувальному планшеті (MaxiSorp, Nunc, Denmark). Фактор VIIa (10нМ) та Фактор X (0,8мкМ) у 100мкл 50мМ Hepes, pH 7,4, що містить 0,1М NaCl, 5мМ CaCl<sub>2</sub> та 1мг/мл альбуміну сироватки великої рогатої худоби, інкубують протягом 15хв. Розщеплення Фактора X після цього припиняють шляхом додавання 50мкл 50мМ Hepes, pH 7,4, що містить 0,1М NaCl, 20мМ EDTA та 1мг/мл альбуміну сироватки великої рогатої худоби. Кількість утвореного Фактора Ха вимірюють шляхом додавання хромогенного субстрату Z-D-Arg-Gly-Arg-p-нітроаніліду (S-2765, Chromogenix, Sweden), кінцева концентрація 0,5мМ. Оптичну густину при 405нм вимірюють безперервно у читувальному пристрої для планшетів SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). Оптичну густину, отриману протягом 10 хвилин, після віднімання оптичної густини у порожній лунці, яка не містила FVIIa, використовують для розрахунку співвідношення між протеолітичною активністю випробуваного та контрольного Фактора VIIa.

#### Аналіз (III)

Вимірювання функціонального in vivo півперіоду

Вимірювання in vivo біологічного півперіоду здійснюють багатьма способами, як описано в літературі. Приклад аналізу для вимірювання in vivo півперіоду rFVIIa та його варіантів описано під реєстраційним номером FDA 96-0597. Тобто, коагуючу активність FVIIa вимірюють у плазмі, взятої до та під час 24-годинного періоду після введення кон'югату, поліпептиду або композиції. Вимірюють видимий середній об'єм розподілу в стійкому стані й визначають середній кліренс.

#### Аналіз (IV)

##### Біодоступність поліпептидів Фактора VII

Біодоступність вимірюють, наприклад, у моделі собаки таким чином: експерименти здійснюють як перехресне дослідження чотирьох ніг у 12 собак породи бігль, розподілених на чотири групи. Усі тварини отримували випробувану композицію А та контрольну композицію В у дозі приблизно 90мкг/кг у гліцилгліциновому буфері (pH 5,5), що містить хлорид натрію (2,92мг/мл), дигідрат хлориду кальцію (1,47мг/мл), маніт (30мг/мл) та полісорбат 80. Зразки крові беруть через 10, 30 та 60 хвилин і через 2, 3, 4, 6 та 8 годин після первісного введення. Плазму одержують зі зразків і кількість Фактора VII визначають шляхом ELISA.

Біодоступність кожного зразка виражають як відрегульовану до дози площу під кривою концентрації у плазмі для Фактора VII (AUC/доза). Відносну біодоступність виражають як співвідношення між середнім значенням AUC/доза випробуваної та контрольної композиції X 100 і розраховують 90% довірчу межу для відносної біодоступності.

## Амінокислотна послідовність людського Фактора VII дикого типу:

Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-  
5 10 15

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-  
20 25 30 35

Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-  
40 45 50

Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-  
55 60 65 70

Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Leu-Ile-  
75 80 85 90

Cys-Val-Asn-Glu-Asn-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-  
95 100 105

Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-  
110 115 120 125

Cys-Thr-Pro-Thr-Val-Glu-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Ile-Pro-Ile-Leu-Glu-Lys-Arg-  
130 135 140

Asn-Ala-Ser-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Ile-Val-Gly-Gly-Lys-Val-Cys-Pro-Lys-Gly-  
145 150 155 160

Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-  
165 170 175 180

Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Lys-Ile-  
185 190 195

Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-  
200 205 210 215

Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-  
220 225 230

Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-  
235 240 245 250

Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-  
255 260 265 270

Arg-Thr-Leu-Ala-Phe-Val-Arg-Phe-Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-  
275 280 285

Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Leu-Met-Val-Leu-Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-  
290 295 300 305 306

Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-  
310 315 320

Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-  
325 330 335 340

Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-  
345 350 355 360

Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-  
365 370 375

Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-  
380 385 390 395

Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro  
400 405 406

ФІГ.

