

УДК 577.2

# Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии

Н. А. Орлова<sup>1,2</sup>, С. В. Ковнир<sup>1,2</sup>, И. И. Воробьев<sup>1,2\*</sup>, А. Г. Габибов<sup>2</sup>, А. И. Воробьев<sup>3</sup><sup>1</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>3</sup>Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

\*E-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 08.02.2013

**РЕФЕРАТ** Рекомбинантный фактор свертывания крови VIII является одним из самых сложных для промышленного получения белков вследствие низкой эффективности транскрипции его гена, потери большей части полипептида фактора VIII при посттрансляционном процессинге в клетках и нестабильности секретированного белка. Улучшение медицинской помощи больным гемофилией А предполагает постоянное увеличение производства препаратов фактора VIII при повышающихся требованиях к качеству и вирусной безопасности конечного продукта. Более эффективные системы биосинтеза фактора VIII могут быть разработаны с учетом обнаруженных особенностей транскрипции гена фактора VIII в гетерологичных системах, посттрансляционного процессинга и циркуляции зрелого фактора VIII в кровотоке. В обзоре рассмотрены делеционные варианты фактора VIII, секретируемые культивируемыми клетками млекопитающих с большей эффективностью, а также перспективные способы получения лекарственных препаратов фактора VIII пролонгированного действия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** фактор свертывания крови VIII, гемофилия А, гетерологичные системы экспрессии рекомбинантных белков.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** FVIII – фактор свертывания крови VIII; BDD – делеция В-домена (B-domain deleted); ME – международная единица; FVIII:Ag – концентрация антигена FVIII; FVIII:C – прокоагуляционная активность FVIII; vWF – фактор фон Виллебранда. Буква «а» при номере соответствующего фактора свертывания означает активированный фактор.

## ВВЕДЕНИЕ

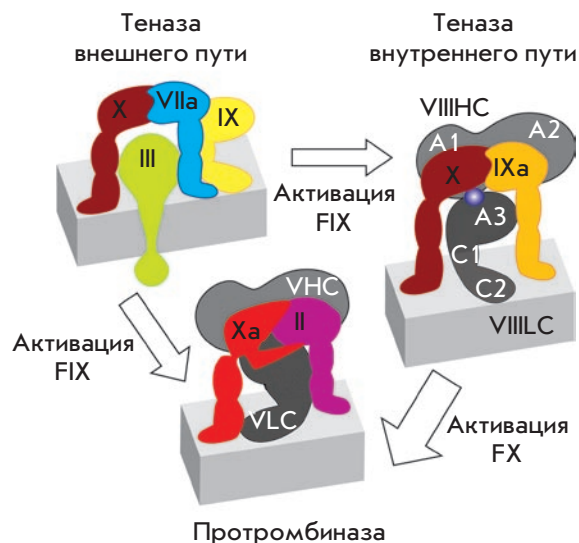
Фактор свертывания крови VIII (FVIII) – это неэнзиматический кофактор активированного фактора IX (FIXa), который при протеолитической активации образует с FIXa плотный нековалентный комплекс, связывающий и активирующий фактор X (FX). Делекции гена *FVIII* могут приводить к развитию гемофилии А – X-связанного рецессивного генетического заболевания с частотой встречаемости около 1 случая на 5000 мужчин. Приблизительно половина всех случаев гемофилии А вызвана инверсиями в интроне 22 гена *FVIII* [1], еще 5% – инверсиями в интроне 1. По состоянию на ноябрь 2012 года в базе данных HAMSTeRS (The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site) описано 2107 различных мутаций гена *FVIII*, проявляющихся как гемофилия А [2], в базе данных SHAMP (The CDC Hemophilia A Mutation Project) на июль 2012 года приведено 2537 мутаций [3].

Единственное эффективное лечение при гемофилии А – регулярно проводимая заместительная терапия препаратами FVIII. Традиционный источник FVIII – это донорская плазма крови, количество которой ограничено. Даже после тщательного скрининга заготовленной плазмы и множественных процедур инактивации вирусов при использовании плазмы в качестве сырья для получения терапевтических белков сохраняется риск передачи вирусных [4, 5] и прионных [6] инфекций. Рекомбинантный фактор VIII человека для терапии гемофилии А может быть получен при помощи культивируемых клеток млекопитающих или в молоке трансгенных животных.

## ФУНКЦИИ ФАКТОРА VIII В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА

Плотный нековалентный комплекс FVIIIa и FIXa образуется на поверхности фосфолипидной мембраны и дополнительно включает молекулу FX, активируемую FIXa. FX покидает комплекс после активации

и запускает, в свою очередь, реакцию превращения протромбина в тромбин (FII в FIIa), который превращает фибриноген в основной компонент тромба – фибрин (рис. 1). Тройной комплекс факторов свертывания FIXa, FVIIIa и FX, связанных с фосфолипидной мембраной, обычно называемый «X-аза», или «теназа», представляет собой основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания



**Рис. 1.** Схема сборки теназного комплекса на мембране клеток. Римскими цифрами обозначены факторы свертывания крови в форме проферментов, римскими цифрами с индексом «а» – активированные ферменты. Факторы свертывания ассоциированы с мембраной, фактор III – трансмембранный белок. VIIIHC – тяжелая цепь фактора VIII, VIII LC – легкая цепь фактора VIII, белым шрифтом обозначены домены A1, A2, A3, C1, C2 в составе цепей FVIII. VHC – тяжелая цепь фактора V, VLC – легкая цепь фактора V. Толщина белых стрелок соответствует различиям в скорости реакций

крови. Функционально аналогичный теназе комплекс может быть описан для внешнего пути свертывания (FIII, FVIIa, FIX, FX), однако его энзиматическая эффективность значительно ниже, чем у «внутренней» теназы. Уникальной особенностью теназного комплекса является огромная степень усиления каталитической эффективности малоактивной протеиназы FIXa, сообщаемая FVIIIa – около пяти порядков [7]. Подобное усиление обусловлено прежде всего изменением конформации активного сайта FIXa при связывании с FVIIIa [8]. Гомолог фактора VIII – фактор V – аналогичным образом потенцирует активность FXa в составе комплекса протромбиназы с коэффициентом усиления каталитической эффективности ×240.

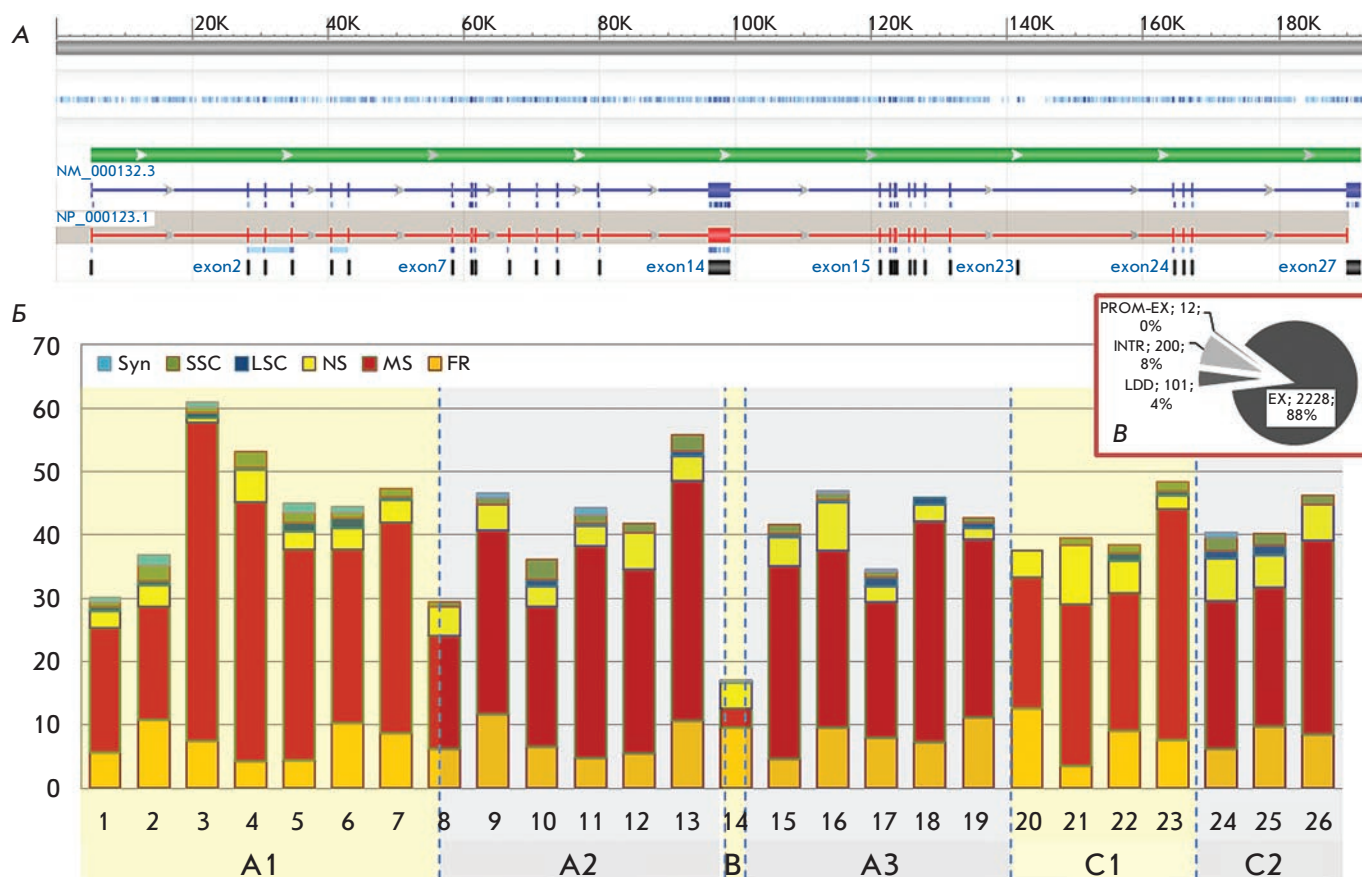
Функциональную активность FVIII измеряют при коагуляции плазмы крови с удаленным эндогенным FVIII и добавленным исследуемым раствором FVIII. Стабильность FVIII в кровотоке изучают на модельных животных с поврежденным или удаленным геном *FVIII*. Животные модели гемофилии А рассмотрены в обзорной статье [9].

### СТРУКТУРА ГЕНА FVIII И ОСОБЕННОСТИ ЕГО ЭКСПРЕССИИ

Ген *FVIII*, локализованный на большом плече X-хромосомы, занимает участок длиной порядка 186 т.п.н. и состоит из 26 экзонов размером от 69 до 3106 п.н. и интронов размером от 207 п.н. до 32.4 т.п.н. Общая длина кодирующей последовательности этого гена равна 9 т.п.н. [10, 11] (рис. 2). Экспрессия гена *FVIII* тканеспецифична и фиксируется преимущественно в клетках печени [12–14]. Наибольший уровень мРНК и белка FVIII выявлен в клетках эндотелиальной выстилки синусоидных капилляров (синусоидов) печени [15, 16], значимые количества FVIII присутствуют также в гепатоцитах и клетках Купфера (резидентных макрофагах выстилки синусоидов).

**Таблица 1.** Доменная организация фактора VIII с указанием границ доменов

A1	a1	A2	a2	B	a3	A3	C1	C2	Источник
1–329	331–372	380–711	700–740	741–1648	1649–1689	1649–2019	2020–2172	2173–2332	[21]
1–336	337–372	372–710	711–740	741–1648	1649–1689	1690–2019	2020–2172	2173–2332	[22]
1–336		372–710		741–1648		1896–2019	2020–2172	2173–2332	[23]
1–336	337–374	375–719	720–740		1649–1690	1691–2025			[24]



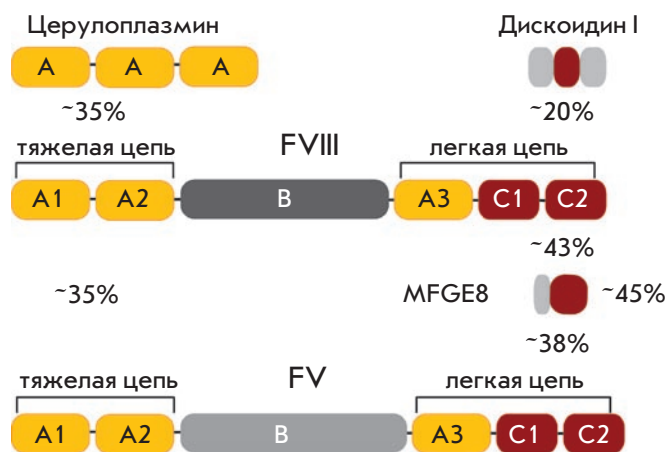
**Рис. 2.** Структура гена *FVIII* и частота мутаций, вызывающих гемофилию А. А – Ген *FVIII* на хромосоме X человека, референсная последовательность NCBI: NG\_011403.1. Транскрибируются два продукта альтернативного сплайсинга. Функциональный полноразмерный белок FVIII кодируется транскрипционным вариантом 1, референсная последовательность мРНК NM\_000132.3, референсная последовательность белка NP\_000123.1. Б – Варианты мутаций гена *FVIII* в экзонах по данным [3]. Число мутаций на 100 п.н. кодирующей ДНК. Обозначения: Syn – синонимичная замена; NS – нонсенс-мутация; MS – миссенс-мутация; FR – сдвиг рамки; SSC – небольшая структурная перестройка (в рамке, <50 п.н.); LSC – большая структурная перестройка (>50 п.н.). Номера столбцов гистограммы соответствуют номерам экзонов. Соответствующие домены белка FVIII указаны под номерами экзонов. Длина экзона 1 в мРНК 314 п.н., при расчетах использована длина кодирующей части – 143 п.н. (включая сигнальный пептид); длина экзона 26 в мРНК 1965 п.н., при расчетах использована длина кодирующей части 156 п.н. Длины остальных экзонов (п.н.): 2–122, 3–123, 4–213, 5–69, 6–117, 7–222, 8–262, 9–172, 10–94, 11–215, 12–151, 13–210, 14–3106, 15–154, 16–213, 17–229, 18–183, 19–117, 20–72, 21–86, 22–156, 23–145, 24–149, 25–177. В – Варианты мутаций гена *FVIII*. Обозначения: LDD – большие делеции и дупликации в одном или нескольких доменах FVIII; INTR – нарушения сайтов сплайсинга; PROM-EX – мутации в области промотора и делеции промотор-экзон; EX – мутации в экзонах. Используются данные [3] на 18.07.2012.

**ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА**

Зрелый полипептид фактора VIII состоит из 2332 аминокислотных остатков (максимальная длина) и включает структурные домены А1–А2–В–А3–С1–С2 [17, 18] (рис. 2). На границах А-доменов расположены три кислых субдомена, обозначаемые как а1–а3 – А1(а1)–А2(а2)–В-(а3)А3–С1–С2 и играющие важную роль во взаимодействии FVIII с другими белками, в частности с тромбином. Мута-

ции в этих субдоменах приводят к снижению уровня активации фактора VIII тромбином [19, 20]. На настоящий момент сохраняются некоторые разночтения в определении точных границ доменов FVIII, наиболее распространенные варианты границ приведены в табл. 1.

А-домены FVIII на 30% гомологичны друг другу, А-доменам фактора V и медьсвязывающему белку плазмы человека – церулоплазмину (рис. 3). Домен



**Рис. 3.** Доменная организация гомологов FVIII. Цифрами указан уровень гомологии аминокислот (%) для групп доменов. Дискоидин I из *Dictyostelium discoideum*, остальные белки – *H. sapiens*

A1 FVIII координирует ион меди [17, 25–27] (рис. 4). Участок 558–565 домена A2 определяет связывание фактора IXa и его конформационную перестройку в составе теназы [28] (рис. 5).

Домены C1 и C2, входящие в состав легкой цепи зрелого FVIII, гомологичны доменам C1 и C2 FV [29], C-концевым доменам белка MFG8 (milk fat globule EGF factor 8, lactadherin) [30, 31] и фрагменту дискоидина I [32] (рис. 3). Эти домены обладают способностью связывать гликоконъюгаты и кислые фосфолипиды [33]. Домен C2 в FVIII также необходим для связывания с фактором фон Виллебранда (vWF) и селективного взаимодействия с фосфатидилсеринном в мембранах клеток [34] (рис. 5).

Домен В, кодируемый одним протяженным экзоном, частично выщепляется из состава зрелого белка. Домен В содержит 25 потенциальных сайтов N-гликозилирования, 16–19 из которых фактически содержат N-связанные олигосахариды при значительном уровне микрогетерогенности. Гомология В-доменов FVIII человека и мыши невысока, однако у обоих видов эти домены высокогликозилированы, что может свидетельствовать о значимости этой модификации для посттрансляционного процессинга белка [35].

Исходя из значительной гомологии факторов V и VIII, высказывается предположение об эволюционном происхождении гена *FVIII* в результате дубликации. Интересно, что функциональные домены А и С этих белков консервативны, а сходство доменов В ограничивается высокой степенью гликозилирования, что также свидетельствует о функциональной

значимости высокой плотности олигосахаридных групп в домене В FVIII [17, 25–27].

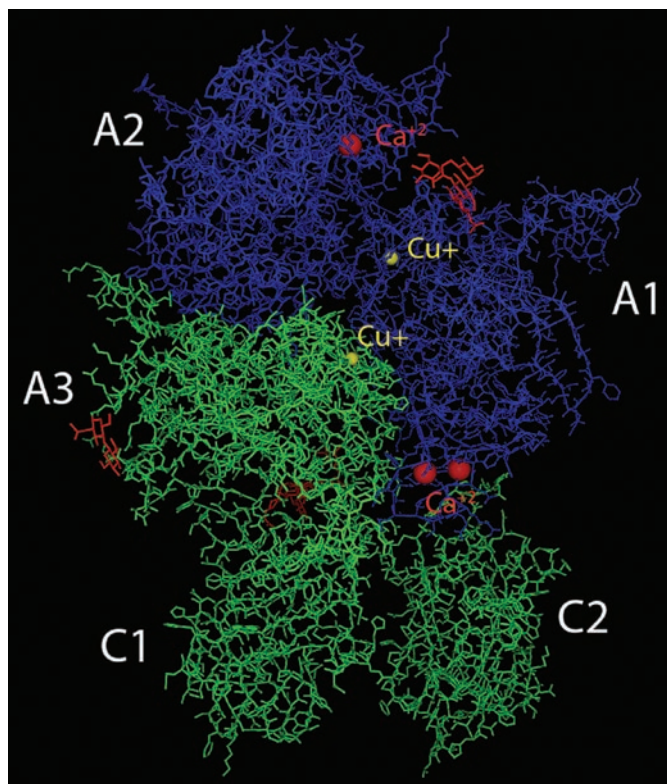
Высокогликозилированный В-домен может участвовать в процессах внутриклеточного транспорта предшественника FVIII и его процессинге, хотя по многочисленным экспериментальным данным удаление области В-домена приводило к увеличению уровня секреции функционально активного FVIII [36, 37].

### КООРДИНИРОВАННЫЕ ИОНЫ МЕТАЛЛОВ

Взаимодействие полипептидной цепи FVIII с ионами металлов определяет структурную целостность зрелого белка и его кофакторную функцию. Наличие ионов меди в составе FVIII показано атомно-адсорбционной спектрометрией; при диссоциации цепей FVIII ионы меди также полностью диссоциируют [38]. Реассоциация разделенных цепей FVIII, в свою очередь, возможна только в присутствии солей меди [39]. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) установлено, что координированные ионы меди в составе FVIII восстановлены до состояния +1 ( $\text{Cu}^+$ ) [40]. В кристаллах делеционного варианта FVIII (вариант BDD SQ) зафиксировано присутствие двух координированных ионов меди, образующих прямые контакты с остатками H267, C310, H315 и H1954, C2000, H2005; т.е. два полноценных сайта связывания иона меди типа I [41] (рис. 4). Оба кармана связывания ионов меди находились вблизи поверхности контакта доменов A1 и A3, однако не участвовали непосредственно в образовании нековалентных связей между доменами. Одновременно с этим, доказательства функциональной значимости получены только для сайта связывания ионов меди в домене A1 как при помощи точечных замен остатков цистеина [40], так и при прямых наблюдениях за координированием ионов меди методом FRET [39]. Дополнительным аргументом в пользу физиологической значимости сайта связывания меди в домене A1 служит мутация C310F в гене *FVIII* [2], которая приводит к тяжелой форме гемофилии А.

Для восстановления прокоагулянтной активности FVIII при диссоциации-реассоциации цепей необходимы как ионы меди, так и ионы кальция или марганца [43, 44]. Ионы кальция или марганца не влияют на димеризацию цепей, но способствуют приобретению активной конформации у восстановленной молекулы FVIII [39], связываясь с сайтами, расположенными на обеих цепях белка [45, 46]. Основной сайт связывания  $\text{Ca}^{2+}$  локализован в A1-домене (область 108–124) [45] и гомологичен соответствующему сайту в молекуле FV [47]. Методом аланинового сканирования установлено, что связывание  $\text{Ca}^{2+}$  опосредовано остатками E110, D116, E122, D125, D126, а взаимодействии с  $\text{Mn}^{2+}$  – остатками D116 и D125 [48].



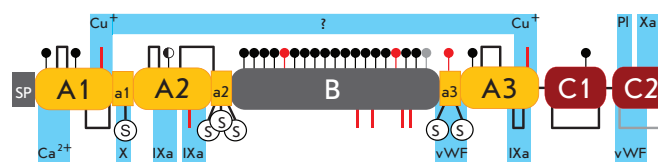


**Рис. 4.** Пространственная структура делеционного варианта FVIII по данным [42]. Коровые остатки N-связанных олигосахаридов отмечены красным, тяжелая цепь FVIII – синим, легкая цепь – зеленым

### ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПРОЦЕССИНГ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА FVIII

FVIII синтезируется в печени, что подтверждается излечением от гемофилии А при пересадке печени. При выделении и очистке популяций клеток печени установлено, что секреция существенных количеств FVIII (0.07 МЕ/млн клеток/день) наблюдается в первичной культуре эндотелиальных клеток синусоидов печени [15]. Успешные попытки иммортализации культивируемых эндотелиальных клеток синусоидов печени на настоящий момент не описаны, поэтому все экспериментальные сведения об особенностях биосинтеза FVIII получены при помощи гетерологичных систем экспрессии, обычно имеющих искусственно увеличенную продуктивность [49].

Транслокация растущей полипептидной цепи FVIII в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭПР), процессинг сигнального пептида длиной 19 аминокислот, а также первичные события формирования дисульфидных связей и присоединения высокоманнозных ядер N-связанных олигосахаридов к цепи FVIII, по-видимому, не лимитируют общую скорость



**Рис. 5.** Схема расположения сайтов посттрансляционных модификаций FVIII. Кружками обозначены сайты N-гликозилирования. Черные кружки – занятые сайты, черно-белый кружок – частично занятый сайт, серый кружок – предположительно занятый сайт, красные кружки – незанятые сайты. Скобками обозначены дисульфидные связи, серая скобка – предположительная дисульфидная связь. Красные вертикальные линии – восстановленные остатки цистеина, состояние остатков цистеина в составе B-домена неизвестно. S – сульфатированные остатки тирозина. Голубым отмечены области взаимодействия с соответствующими факторами свертывания крови, фосфолипидами (PI), фактором фон Виллебранда (vWF) и ионами меди. SP – сигнальный пептид и пропептид

его биосинтеза и подробно описаны [47]. В то же время последующие события редактирования олигосахаридных цепей, дисульфид-изомеризации и фолдинга молекул FVIII могут приводить к перегрузке соответствующих ферментных групп клетки и вызывать активацию систем удержания некорректно процессированных белков в ЭПР или систем рециклинга таких белков. Считается, что общая скорость секреции FVIII лимитирована именно транслокацией предшественника FVIII из ЭПР в аппарат Гольджи; полипептид FVIII может проводить в ЭПР от 15 мин до нескольких дней.

### N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

После первичного N-гликозилирования цепи FVIII и отщепления двух первых остатков глюкозы из олигосахаридных групп гликозидазами I и II (GTI, GTII) полипептид FVIII связывается с лектинами кальнексином (CNX) и кальретинулином (CRT), предотвращающими секрецию незрелого белка [50] (рис. 6). В норме после удаления третьего остатка глюкозы белок освобождается из комплекса с CNX и CRT и транспортируется в аппарат Гольджи. При этом несвернутый или неправильно свернутый FVIII остается в ЭПР, где подвергается реглюкозилированию ферментом UGT (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase) [51], вновь связывается с CNX и CRT и подвергается повторному укорачиванию GTII (так называемый кальнексиновый цикл).

Неправильно свернутые молекулы FVIII, как и другие белки, направляются из ЭПР в протеасомы

цитозоля по пути ERAD (ER-associated degradation), при этом извлечение полипептида из кальнексинового цикла опосредовано специальным белком EDEM [28]. В экспериментах по вытеснению метки (pulse-chase) с инактивацией протеасом лактацистином [50] показано, что значительная часть FVIII действительно проходит деградацию по пути ERAD вместо транслокации в комплекс Гольджи, однако инактивация протеасом увеличивала количество внутриклеточного FVIII, но не его концентрацию в культуральной среде. Таким образом, путь ERAD сам по себе не вымывает существенных количеств FVIII из просвета ЭПР и не может быть причиной ограниченного перехода FVIII из ЭПР в аппарат Гольджи. Поскольку основная часть N-связанных олигосахаридов в молекуле FVIII локализована в В-домене, делеционные варианты FVIII менее подвержены удерживанию в ЭПР в кальнексиновом цикле, что частично объясняет увеличенный уровень их секреции.

### ФОРМИРОВАНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Согласно результатам моделирования пространственной структуры FVIII и большинства экспериментальных работ, молекула FVIII содержит восемь дисульфидных связей – по две в доменах А, по одной в доменах С и три восстановленных остатка Cys в доменах А1, А2, А3 (рис. 5). Определенных данных о состоянии остатков цистеина в составе В-домена нет. Семь из восьми дисульфидных связей расположены внутри полипептидной глобулы, а связь С1899–С1903 (домен А3) экспонирована на поверхности. При проведении группой Пайпа серии замен остатков цистеина на остатки серина или глицина установили, что все семь неэкспонированных дисульфидных связей необходимы для поддержания структурной целостности молекулы FVIII, а удаление связи 1899–1903 улучшает секрецию FVIII в 2 раза, не меняя его функциональной активности [52]. Весьма вероятно, что удаление единственной экспонированной дисульфидной связи приводит к подавлению удерживания FVIII в ЭПР, связанного с контролем работы дисульфидизомераз [53], однако, конкретный механизм такого контроля в отношении FVIII и участвующие в нем белки практически не изучены.

### ФОЛДИНГ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ШАПЕРОНАМИ ЭПР

Фактор VIII в просвете ЭПР образует прочный комплекс с главным шапероном ЭПР GRP78 (glucose-regulated protein MW 78.000), также называемым BiP (immunoglobulin-binding protein) [54], одним из важных компонентов сигнального пути UPR (unfolded protein response). Обычно синтез BiP индуцируется

при голодании клеток по глюкозе, ингибировании N-гликозилирования и в присутствии некорректно фолдированных белков в ЭПР [55], в частности, при сверхэкспрессии FVIII [56]. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия FVIII человека в культивируемых клетках вызывает общую активацию UPR, наблюдаемую не только как положительную регуляцию BiP, но и как активацию гена *ERSE* и увеличение уровня сплайсинга мРНК *XBP1* [57]. Таким образом, BiP может быть не единственным шапероном, инициирующим активацию UPR при попадании больших количеств FVIII в просвет ЭПР.

BiP в комплексе с полипептидом обладает АТФ-азной активностью, гидролиз АТФ необходим для распада комплекса. Отделение FVIII от BiP и секреция требуют необычно высоких затрат АТФ [58].

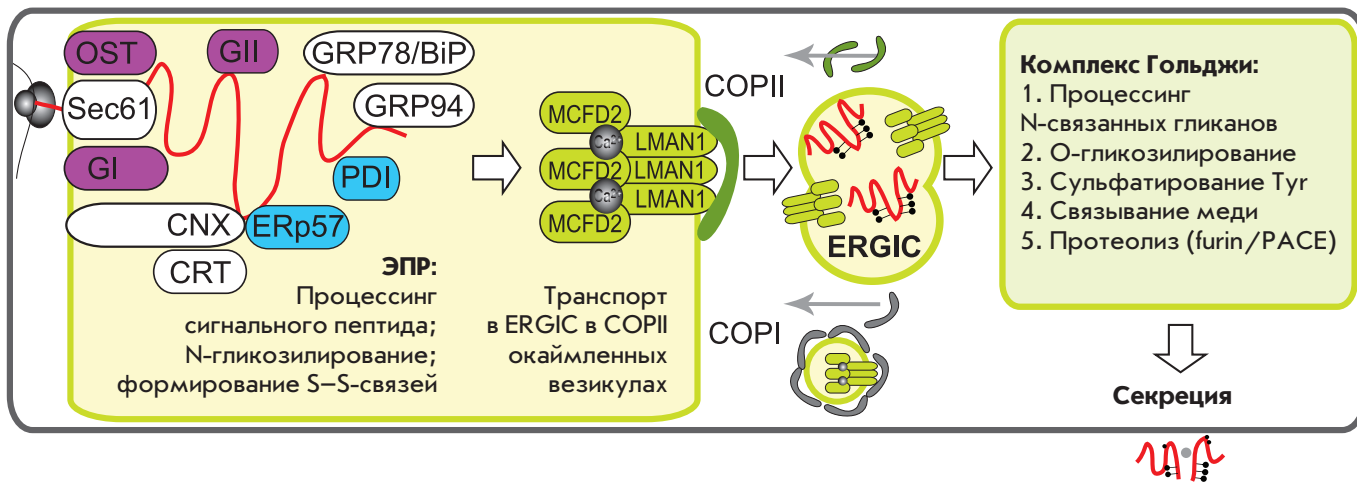
Гомолог FVIII, фактор V, в отличие от FVIII, не взаимодействует с BiP. При помощи серии химерных белков FVIII-FV был идентифицирован сайт связывания FVIII с BiP – гидрофобный β-лист в составе домена А1, лежащий вблизи остатка С310, который входит в состав сайта связывания иона меди типа I [40, 59]. BiP образует прямые контакты с гидрофобными аминокислотами, и точечная мутация F309S внутри этого β-листа увеличила секрецию FVIII в 3 раза, что коррелировало со снижением затрат АТФ [59]. Поскольку остаток F309 соседствует с С310 – ключевым остатком сайта координирования меди в домене А1, можно предположить, что BiP участвует и в присоединении ионов меди к FVIII.

Около трети молекул FVIII в ЭПР ассоциированы между собой в нековалентные высокомолекулярные агрегаты. Снижающая агрегацию замена участка FVIII 227–336 на гомологичный участок FV также уменьшает его аффинность к BiP и увеличивает секрецию [60]. Возможно, функциональное значение комплекса FVIII-BiP состоит преимущественно в удержании FVIII в ЭПР, а не в обеспечении эффективного фолдинга FVIII перед транслокацией в аппарат Гольджи.

### ТРАНСПОРТ FVIII ИЗ ЭПР В АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

Транспорт полипептида FVIII из ЭПР в Гольджи проходит через промежуточный компартмент ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) (рис. 6). FVIII и FV рекрутируются в этот компартмент, связываясь с трансмембранным белком (карго-рецептором) ERGIC-53, также называемым LMAN1 (lectin, mannose-binding protein 1), обеспечивающим маннозоселективное кальций-зависимое связывание и транспорт гликопротеинов из ЭПР в аппарат Гольджи [61].

Мутации, приводящие к утрате функции LMAN1 или нарушающие взаимодействие LMAN1 с компо-



**Рис. 6.** Схема внутриклеточного транспорта секретируемого полипептида FVIII. OST – олигосахарилтрансфераза, Sec61 – белокпроводящий канал, GI и GII – глюкозидазы I и II; CNX – кальнексин, CRT – кальретикулин, GRP78/BiP – glucose regulated protein 78 / immunoglobulin-binding protein; GRP94 – glucose regulated protein 94; PDI, ERp57 – дисульфидизомеразы; MCFD2 – multiple coagulation factor deficiency protein 2; LMAN1 – маннозсвязывающий лектин 1; COPI, COPII – белки окаймленных везикул I и II; ERGIC – промежуточный компартмент

нением транспортного комплекса MCFD2 (multiple coagulation factor deficiency protein 2), вызывают наследственную коагулопатию – комбинированный дефицит факторов V и VIII [62–64]. Уровень FVIII в плазме больных с мутантным LMAN1 снижается до 5–30% от нормы [65].

Методом химических сшивок доказан транспорт четырех белков – FV, FVIII и белков лизосом – катепсинов catC и catZ – через промежуточный компартмент с участием комплекса LMAN1–MCFD2 [66, 67]. Ряд других белков при транспорте взаимодействует с LMAN1, но не с MCFD2 [68]. При помощи поперечных сшивок белков обнаружено, что 5–20% общего внутриклеточного FVIII находится в комплексе с LMAN1 и MCFD2 [69]. Для образования комплекса FVIII с обоими партнерами необходимы ионы кальция, при этом комплекс FVIII–MCFD2 может образовываться независимо от LMAN1. Остается неясным, возможно ли прямое взаимодействие FVIII и LMAN1, обнаруженное для катепсинов catC и catZ [70], или комплекс FVIII–LMAN1 образуется только при участии MCFD2. Специфический мотив FVIII, который узнается карго-рецептором, не установлен. Теоретически такой мотив должен включать конформационный эпитоп и углеводный компонент (для того, чтобы транспорту подвергались только правильно фолдированные и посттрансляционно модифицированные белки). Мотив связывания LMAN1 был экспериментально найден в молекуле профермента catZ, он содержал несколько близко расположенных

N-гликанов [37], однако гомологичные ему участки в FVIII и FV отсутствуют.

FV и FVIII имеют сходную доменную структуру, включающую негомологичные, но в обоих случаях содержащие множество сайтов N-гликозилирования B-домены. Поскольку у FVIII с делецией B-домены снижена эффективность связывания с комплексом LMAN1–MCFD2, предполагают, что LMAN1 взаимодействует преимущественно с B-доменами [71]. Между тем, блокирование N-гликозилирования не вызывает прекращения образования комплекса FVIII с карго-рецептором [69], т.е. во взаимодействии FVIII с карго-рецептором участвует не только углеводная часть молекулы, но и полипептидная цепь.

Комплекс LMAN1–MCFD2 специфически рекрутирует FVIII и FV из ЭПР в везикулы COPII (coat protein II), которые отделяются от ЭПР и после этого связываются с ERGIC (рис. 6). Механизм освобождения полипептида FVIII из комплекса LMAN1–MCFD2 при транспорте не установлен; предполагается, что оно осуществляется за счет изменения локального pH и концентрации кальция [71]. Белки комплекса COPII возвращаются в ЭПР вне везикул, комплексы ERGIC подвергаются ретроградному транспорту в составе везикул COPI, а дальнейший транспорт FVIII проходит, по-видимому, в везикулах неизвестного состава либо при помощи транспортных контейнеров, ассоциированных с микротрубочками. Появление молекул FVIII в аппарате Гольджи происходит путем образования новых цистерн *цис*-Гольджи [71–73].



### ПРОЦЕССИНГ FVIII В АППАРАТЕ ГОЛЬДЖИ

В аппарате Гольджи осуществляется модификация высокоманнозных N-гликанов молекулы FVIII, O-гликозилирование и сульфатирование остатков тирозина, протекающее в *транс*-Гольджи. В FVIII человека обнаружено шесть активных сайтов сульфатирования остатков тирозина в позициях 346, 718, 719, 723, 1664, 1680, расположенных преимущественно в области кислых субдоменов  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  и окружающих точки расщепления FVIII тромбином. Все шесть сайтов сульфатирования необходимы для полной активности фактора VIII; ингибирование сульфатирования приводило к 5-кратному падению функциональной активности FVIII [74]. Также показано, что сульфатирование остатка Y1680 необходимо для эффективного взаимодействия FVIII с фактором фон Виллебрандта. Природная мутация Y1680F проявляется как гемофилия A средней тяжести. FVIII у пациентов, обладающих данной мутацией, сохраняет нормальную активность, но имеет уменьшенное время полураспада [75]. При помощи сайт-направленного мутагенеза группой Кауфмана было показано, что присутствие сульфатированных остатков в позициях 346 и 1664 увеличивает скорость активации FVIII тромбином, а сульфатирование остатков 718, 719, 723 увеличивает удельную активность FVIIIa в теназном комплексе, и подтверждена необходимость сульфатирования остатка 1680 для образования комплекса с фактором фон Виллебрандта [76].

Последней стадией процессинга FVIII в *транс*-Гольджи перед секрецией является ограниченный протеолиз одноцепочечного предшественника по остаткам R1313 и R1648 с образованием легкой и тяжелой цепи [22]. Оба сайта протеолитического процессинга соответствуют мотиву Arg-X-X-Arg, расщепляемому протеазой фурин/PACE (paired basic amino acid cleavage enzyme), однако конкретная сигнальная протеаза семейства PACE, ответственная за процессинг FVIII, не установлена.

### ФАКТОР VIII В КРОВТОКЕ

В плазме крови зрелый природный FVIII, представленный серией форм с молекулярной массой 170–280 кДа, находится в концентрации 0.1–0.2 мкг/мл [77]. Практически весь FVIII в плазме входит в состав комплекса с шапероном – фактором фон Виллебрандта, который выделяют клетки эндотелия сосудов. Районы FVIII, ответственные за связывание с этим шапероном, картированы в легкой цепи – в кислом субдомене  $\alpha 3$  [78], доменах C2 [34, 79] и C1 [80]. Фактор фон Виллебрандта стабилизирует FVIII в кровотоке и является его ключевым регулятором – позволяет тромбину активировать связанный

FVIII [36, 81, 82] и препятствует расщеплению молекул неактивированного FVIII протеазами FXa [83] и активированный белок C (activated protein C, APC) [84–86]. Кроме того, vWF предотвращает неспецифическое связывание FVIII с мембранами клеток эндотелия сосудов [61] и тромбоцитов [87]. В опытах *in vitro* показано, что vWF способствует ассоциации цепей FVIII и сохранению прокоагулянтной активности в кондиционированной среде клеток-продуцентов FVIII [44, 49], аналогичные данные получены для реассоциации цепей FVIII в растворе [43, 44]. Константа диссоциации комплекса vWF-FVIII составляет 0.2–0.4 нМ, практическое равновесие при образовании комплекса *in vitro* достигается за секунды [61, 88, 89].

У значительной части больных гемофилией A в кровотоке появляются ингибиторы вводимого экзогенного FVIII, блокирующие его прокоагулянтную активность [90]. Известны также случаи развития «приобретенной гемофилии A» у пациентов с нормальным геном FVIII за счет появления антител на аутологичный FVIII [91]. Этиология возникновения ингибиторных антител в целом неясна, в настоящий момент обнаружены определенные корреляции между появлением ингибиторных антител и HLA-гаплотипом [92] или характером мутации гена фактора VIII [93]. Среди ингибиторных антител преобладают антитела класса IgG [94]. Установлено, что аллоантитела связываются преимущественно с доменами A2 или C2 фактора VIII и препятствуют его взаимодействию с фактором FIX, тогда как аутоантитела связываются преимущественно с C2-доменом FVIII, что предположительно приводит к блокированию его взаимодействия с фосфолипидами и vWF [95]. Кроме того, показано, что антитела к фактору VIII способны к специфическому гидролизу FVIII [96], причем протеолитическая активность аллоантител прямо пропорциональна уровню ингибитора FVIII [97].

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ FVIII С FIXA, FX И ФОСФОЛИПИДАМИ

Белок-белковые контакты FVIII (или FVIIIa) с FIXa в составе теназы обеспечиваются двумя различными областями, при этом основная контактная поверхность расположена на легкой цепи FVIII (рис. 1). Свободная легкая цепь имеет сходную с полноразмерным FVIII аффинность к FIXa ( $K_d$  14–50 нМ [67, 98], а у полноразмерного FVIII  $K_d$  ~ 2–20 нМ [99, 100]). Основным сайтом взаимодействия FVIII и FIXa представляет собой короткий пептид 1803–1810 [101], второй сайт взаимодействия FVIII и FIXa – область 558–565 [67]. Область прямого взаимодействия FVIII и FX обнаружена в кислом C-концевом субдомене домена



A1 (337–372) [71, 77], но, скорее всего, это взаимодействие не имеет существенного значения для работы теназного комплекса. Присутствие фосфолипидов необходимо для осуществления кофакторной функции FVIII [7, 102, 103]. *In vivo* FVIII взаимодействует с фосфолипидами активированных тромбоцитов и клеток поврежденного эндотелия. Показано, что оба неэнзиматических кофактора системы свертывания – FVIII и FV связываются с фосфатидилсерин [38, 104]. Фактор VIII преимущественно связывается с мицеллами, содержащими 15–25% фосфатидилсерина, при этом константа диссоциации достигает 2–4 нМ [89, 99, 102]. Содержание фосфатидилсерина в мембране тромбоцитов может увеличиваться при их активации с 2 до 13%, привлекая таким образом FVIII. Активация FVIII в 10 раз повышает его аффинность к фосфолипидам [105]. Сайт связывания фосфолипидов локализован в легкой цепи FVIII в области домена C2 [106] (рис. 5).

### АКТИВАЦИЯ FVIII И ИНАКТИВАЦИЯ FVIIIa

Активация FVIII *in vivo* осуществляется тромбином или FXa (рис. 7) и состоит во внесении протеолитических разрывов в нескольких точках. При активации FVIII тромбином разрывы вносятся в позиции R372, R740 и R1689 [107] и приводят к отделению В-домена, разделению тяжелой цепи на несвязанные ковалентно домены A1 и A2, а также к удалению короткой кислой области a3 перед доменом A3. В ряде источников область a3 называется активационным пептидом FVIII, однако продуктивная активация FVIII не может быть сведена к удалению области a3 из состава молекулы. Активация FVIII фактором FXa приводит к разрыву полипептидной цепи FVIII по указанным сайтам и двум или трем дополнительным разрывам в положении R1721, R336 и K36 [63, 107]. Продуктивное взаимодействие FVIII с тромбином опосредовано остатками сульфатированного тирозина в FVIII, а активация FVIII фактором FXa практически нечувствительна к замене Y → F в сайтах сульфатирования [76]. FVIIIa, полученный активацией FXa, образует значительно менее продуктивную теназу, чем FVIIIa, активированный тромбином [108]; таким образом, активацию FVIII при помощи FXa можно рассматривать как побочный процесс при инактивации FVIIIa.

Инактивация FVIIIa может протекать спонтанно и сводиться к отделению от молекулы FVIIIa домена A2 тяжелой цепи, не связанного с остальными доменами FVIII ковалентными связями [109, 110]. В настоящий момент выделяют два специфических инактиватора FVIIIa – APC и FXa. APC расщепляет FVIIIa в положении R562 и R336 [71], при этом разрушается область контакта FVIIIa и FIXa и дестабилизируется взаимодействие доменов A1 и A2.

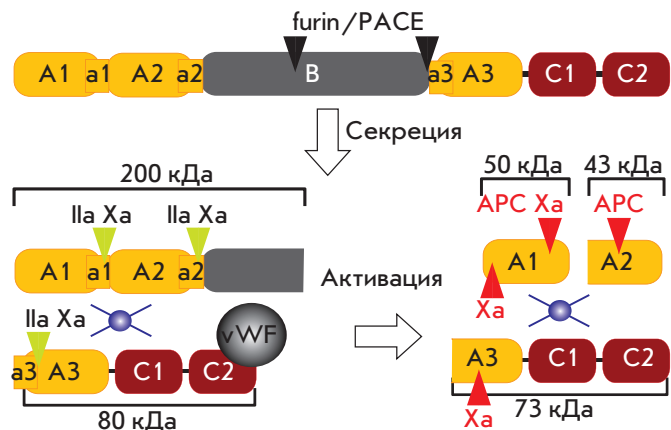


Рис. 7. Протеолитический процессинг FVIII. Черные треугольники – сайты процессинга протеазами семейства фурин/ PACE, зеленые треугольники – сайты расщепления FVIII при активации, красные треугольники – сайты расщепления FVIII и FVIIIa при инактивации. Синим кружком обозначен координированный ион меди

Инактивация FVIIIa при помощи FXa, по-видимому, происходит *in vivo* более активно, чем инактивация APC, и представляет собой внесение разрывов в позициях R336 и K36 [73], что приводит к дестабилизации домена A1 и ускоренному отделению свободного домена A2.

### УДАЛЕНИЕ FVIII ИЗ СИСТЕМНОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ

Комплекс FVIII с vWF в основном выводится из циркуляции специализированным клиренсным рецептором LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), представленным на мембране гепатоцитов [111–113]. В экспериментах *in vivo* на мышах наблюдали 3.3-кратное увеличение времени полувыведения FVIII при блокировании LRP ассоциированным с рецептором белком 39 кДа (RAP), который связывается с LRP с высокой аффинностью [111]. Во взаимодействии фактора VIII с LRP участвуют три сайта – в C2-домене [112], в A3-домене (1804–1834) [101] и в A2-домене (484–509) [111]. Множественные сайты взаимодействия FVIII с LRP обеспечивают эффективное удаление из циркуляции свободных цепей и отщепленного домена A2. Присутствие vWF в комплексе с FVIII в районе домена C2 предотвращает взаимодействие этого домена с LRP, отчего аффинность к LRP снижается на 90% [112]. *In vivo*-взаимодействие FVIII и его фрагментов с LRP опосредуется гепарансульфатпротеогликанами (HSPG), взаимодействующими с областью 558–565 в домене A2 [114].

Таблица 2. Лекарственные препараты рекомбинантного FVIII

Название	Kogenate®, Helixate®	Kogenate FS®, Kogenate Bayer®, Helixate FS®, Helixate NexGen®	Recombinate®, Bioclolate®	Advate®	ReFacto®	Xyntha®, ReFacto AF®
Производитель	Bayer Healthcare		Baxter		Pfizer	
Поколение	1	2	1	3	2	3
Разрешение на продажу в США	1993	2000	1992	2003	2000	2008
Линия-производитель	ВНК		СНО		СНО	
Гетерологические гены	FVIII		FVIII, vWF		FVIII BDD SQ	
Белки в культуральной среде	Белки плазмы крови человека		БСА, апро- тинин	Нет	БСА	Нет
Иммуно-аффинная хроматография	Да		Да		Да	Нет
Стабилизатор	ЧСА	Сахароза	ЧСА	Маннитол, трегалоза	Сахароза	
Вирус-инактивация	ДР		Пастеризация	ДР	ДР	ДР, НФ

**Примечание.** ЧСА – человеческий сывороточный альбумин, БСА – бычий сывороточный альбумин, ДР – обработка детергентом и растворителем, НФ – нанофильтрация.

### РЕКОМБИНАНТНЫЙ FVIII ДЛЯ ТЕРАПИИ ГЕМОФИЛИИ

Лекарственные препараты рекомбинантного полноразмерного FVIII были практически одновременно разработаны биотехнологическими компаниями Genetics Institute и Genentech на основе систем экспрессии гена *FVIII* в клетках СНО и ВНК [66, 115] и одобрены для клинического применения уже в 1992–1993 годах с международным непатентованным названием «октоког альфа». Рекомбинантный FVIII, секретлируемый клетками СНО в комплексе с рекомбинантным vWF [49, 77], выпущен под торговыми названиями Recombinate® и Bioclolate®. Рекомбинантный FVIII, секретлируемый клетками ВНК в культуральную среду, содержащую природный vWF [115], получил торговые названия Kogenate® и Helixate® (табл. 2).

В настоящий момент различают три поколения лекарственных препаратов рекомбинантных факторов свертывания крови [68]: препараты первого поколения содержат человеческий сывороточный альбумин и контактируют с веществами животного происхождения в процессе производства; в препаратах второго поколения готовая лекарственная форма не содержит альбумина в качестве вспомогательного вещества; в препаратах третьего поколения контакт с вещества-

ми животного происхождения и компонентами донорской плазмы исключен во всем процессе производства. Предположительно, минимизация использования компонентов плазмы и белков животного происхождения может уменьшить риск инфицирования пациентов вирусами и прионами [116]. В настоящее время нет ни одного подтвержденного факта передачи инфекционных агентов при использовании рекомбинантных препаратов FVIII первого и второго поколения.

Схема получения препаратов полноразмерного рекомбинантного FVIII включает несколько стадий ионообменной хроматографии, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных моноклональных антител, инактивацию вирусов при помощи обработки растворителем и детергентом или пастеризацией в присутствии детергента [67, 117]. Препараты рекомбинантного FVIII неизбежно содержат следовые количества белков клеток-производителей и мышинового IgG, поэтому в ходе клинических испытаний исследовали появление у пациентов антител к этим примесям и влияние таких антител на эффективность терапии. У части больных отмечено образование антител, однако связь между иммунным ответом на примесные белки и эффективностью терапии не была установлена [68].

Таблица 3. Делеционные варианты FVIII

Последовательность	Название варианта	Область делеции	Источник
↓ ...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD...SQNPPVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI... ↓ ↓ ↓ *	Natural single chain	–	[11]
...EPR-COOH (?) NH2-EITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	Natural 90+80, seq.1	741?–1648	[119]
...EPR-COOH (?) NH2-LQSDQEEIDYDDTI...	Natural 90+80, seq.2	741?–1654	[119, 120]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNA-----NPPVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	LA-VIII	760–1639	[118]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD-----DTI...	deltaII	771–1666	[121]
...EPR-----EITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	d741-1648	741–1648	[74]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...LLR---DPL...QNPPVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	90-142-80	797–1562	[122]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...LLR---DPL...QNPPVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	–	746–1562	[123]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...PPVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	BDD SQ	746–1639	[119]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...QNPPVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	N0, N8	751–1637	[124, 125]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...QAYRYRR-----QREITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	human-cl	747–1640**	[126]
...EPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI...SST-----REITRRTLQSDQEEIDYDDTI...	226aa/N6	968–1647	[127]

Примечания: значком ↓ обозначены сайты процессинга FVIII, расщепление после аминокислоты, на которую указывает стрелка; \* – минорный сайт процессинга природного FVIII; \*\* – область 1641–1647 заменена на искусственный участок.

### РЕКОМБИНАНТНЫЙ FVIII С ДЕЛЕЦИЕЙ В-ДОМЕНА

Циркулирующий в кровотоке природный FVIII содержит множественные формы укороченного В-домена, которые образуются при протеолизе полноразмерной двухцепочечной молекулы, и прокоагулянтные свойства таких вариантов FVIII не имеют существенных различий [118], поэтому в ряде работ были получены и охарактеризованы варианты рекомбинантного FVIII с направленной делецией области В-домена. В работе группы Кауфмана из кДНК FVIII был удален участок, кодирующий аминокислотные остатки 760–1639, т.е. практически всю область В-домена [118] (табл. 3).

Уровень прокоагулянтной активности FVIII в кондиционированной среде для клеток COS-1, трансфицированных плазмидой с кДНК делетированной формы FVIII (вариант LA-VIII), был примерно в 10 раз выше, чем в контрольной линии, трансфицированной аналогичной плазмидой, кодирующей полноразмерный FVIII. При дальнейших исследованиях было

установлено, что вариант LA-VIII полностью аналогичен природному FVIII по биохимическим свойствам, за исключением повышенной чувствительности легкой цепи LA-VIII к расщеплению тромбином [36]. В более продуктивных линиях-продуцентах FVIII делеция В-домена (вариант LA-VIII) приводила к увеличению уровня мРНК FVIII в 17 раз, но концентрация секретированного продукта возрастала только лишь на 30% [37]. Сходные данные получены для варианта FVIII deltaII, содержащего делецию 771–1666 [121], при этом уровень секреции FVIII в клетках ВНК достигал 0.6 МЕ/мл, а секретированный продукт содержал в основном одноцепочечную форму 170 кДа и две дополнительные формы тяжелой цепи 120 и 90 кДа [128]. Аналогичное преимущественное накопление одноцепочечной формы FVIII зафиксировано также при делеции участков 741–1648, 741–1668, 741–1689 [74]. Частичная делеция остатков 797–1562 в В-доме (вариант 90-142-80) также приводила к появлению полностью ак-

тивного FVIII [122], однако инъекция этого варианта кроликам вызывала появление специфических антител к линкерной области белка [129], что могло потенциально увеличить частоту образования ингибиторных антител при терапевтическом применении.

В большинстве гетерологичных систем экспрессии FVIII с делецией В-домена отмечено многократное увеличение уровня секреции продукта в сравнении с полноразмерным FVIII, такого изменения не наблюдалось в случае делеции области 741–1668, однако при замене линии CHO клеток-продуцентов на линию клеток SK-HEP-1 уровень секреции делеционного варианта FVIII был увеличен до 3.5 МЕ/млн клеток/день [130]. Интересно отметить, что раздельная экспрессия в клетках CHO генов, кодирующих укороченную тяжелую и полную легкую цепи FVIII с сигнальными пептидами тяжелой цепи позволяет достигнуть уровня экспрессии 15 МЕ/млн клеток/день [123]. Единственным, но неустраняемым ограничением такой системы экспрессии FVIII остается загрязнение продукта непроецированной формой легкой цепи размером 90 кДа, по-видимому, содержащей С-концевой фрагмент В-домена.

Для создания рекомбинантного FVIII, не содержащего как В-домена, так и неприродного линкерного участка между тяжелой и легкой цепями, необходимо было определить такие точки начала и конца области делеции, которые позволили бы сохранить доступность доминантных сайтов процессинга природного FVIII до его «минимальной» двухцепочечной формы – R740 и R1648. Линд и соавт. [119] при систематическом переборе вариантов делеции В-домена обнаружили, что высокий уровень процессинга одноцепочечного предшественника FVIII по данным сайтам достигается при делеции остатков 746–1639 (вариант BDD SQ). При этом значимое протеолитическое расщепление цепей по другим сайтам отсутствовало. В данном варианте делеции точка соединения полипептидов тяжелой и легкой цепей FVIII попадала в середину отделяющегося линкерного пептида длиной 14 аминокислотных остатков. При N-концевом секвенировании легкой цепи секретированного FVIII BDD SQ было подтверждено преимущественное расщепление предшественника после остатков R1648 и S1657, т.е. совпадение N-концевого участка легкой цепи с природной последовательностью. Тяжелая цепь FVIII BDD SQ содержала С-концевой участок 729–740 и частичный линкерный пептид [120]. Таким образом, вариант BDD SQ позволял наиболее точно реконструировать присутствующий в кровотоке «минимальный» двухцепочечный вариант FVIII. Получены варианты лекарственной формы очищенного препарата FVIII BDD SQ – раствор с вы-

соким содержанием сахаридов [131] и безальбуминовый лиофилизат [132]. Лиофилизованная форма BDD SQ сохраняла стабильность в течение двух лет [133] и использовалась в последующих клинических испытаниях, показавших фармакологическую эффективность и безопасность препарата [134]. Вместе с тем время полураспада в кровотоке делеционной формы FVIII BDD SQ (международное непатентованное название «мороктоког альфа») было немного меньше, чем полноразмерного FVIII из донорской плазмы.

Исходный вариант промышленного процесса получения FVIII BDD SQ для медицинского применения (торговое название ReFacto®) включал в себя культивирование клеток-продуцентов на основе CHO в перфузионных биореакторах и выделение целевого белка при помощи пяти стадий хроматографии [135]. Вирусинактивацию проводили, обрабатывая промежуточный продукт детергентом и растворителем. Данные о продуктивности разработанной линии-продуцента FVIII BDD SQ отсутствуют. Продуктивность полученной независимо аналогичной линии на основе клеток CHO составила 0.5–2.0 МЕ/мл при культивировании в бессывороточной среде без индукции [136] и до 10 МЕ/мл при индукции экспрессии продукта пропионатом натрия или бутиратом натрия. При последующей модификации промышленного процесса получения FVIII BDD SQ стадию иммуноаффинной хроматографии на моноклональных антителах заменили более безопасной стадией аффинной очистки на иммобилизованном коротком пептиде [137] (торговые названия Xyntha®, ReFacto AF®) (табл. 2).

Эффективность и безопасность лекарственных препаратов FVIII BDD SQ, вполне подтвержденная в ходе клинических испытаний [138–140], впоследствии была подвергнута сомнению при мета-анализе данных множественных постмаркетинговых исследований. В работе Группо и соавт. [141] показано, что профилактическое использование FVIII BDD SQ вместо полноразмерного FVIII приводит к статистически значимому повышению риска внезапных кровотечений. Устойчивость к небольшим вариациям в исходных данных (робастность) примененного метода мета-анализа была рассмотрена в отдельной публикации и подтверждена для широкого диапазона коэффициентов пересчета числа случаев кровотечений, зафиксированных в различных исследованиях [142]. Одной из возможных причин пониженной эффективности FVIII BDD SQ при профилактическом применении могло быть неточное измерение уровня активности FVIII в плазме пациентов, вызванное использованием различных методов коагулометрии и стандартов прокоагуляционной активности FVIII [143], другой причиной, по-видимому, можно считать



уменьшенное время полураспада FVIII BDD SQ [144], вызываемое ускоренной инактивацией активированного FVIII BDD SQ активированным белком С и FXa [145].

В случае другого существенного показателя безопасности лекарственных препаратов FVIII – риска появления ингибиторов, данные для FVIII BDD SQ были несколько противоречивыми. В одних исследованиях частота возникновения ингибиторов была сходной у всех вариантов рекомбинантного FVIII [146–148], в других отмечали повышенный риск появления ингибиторов при применении FVIII BDD SQ [149]. Поскольку вероятность появления ингибиторов сильно варьирует в зависимости от типа мутации, вызвавшей гемофилию, определенных HLA-генотипов и особенностей ведения заместительной терапии, данные, полученные в разных центрах, могут сильно различаться между собой [150].

Аналогичный BDD SQ-вариант FVIII с делецией участка 751–1637 (вариант N8, табл. 3) позднее получили при экспрессии в клетках CHO [125] и использовали в клинических испытаниях, показавших биоэквивалентность N8 и препарата сравнения – полноразмерного рекомбинантного FVIII, при однократном введении в группе из 23 человек [151]. Еще одна промышленно применимая система экспрессии гена делеционного варианта FVIII получена при помощи клеток линии человека HEK293F, при этом ген *FVIII* содержал не прямую делецию области В-домена, а замену участка 747–1648 на «неприродный» пептид QAYRYRRQ [126] (вариант human-cl, табл. 3). Предполагалось, что присутствие в искусственном линкерном пептиде сайтов процессинга протеиназы Kex2/фурин позволит повысить уровень распада одноцепочечной формы FVIII, однако оказалось, что степень процессинга одноцепочечной формы вариантов BDD SQ и human-cl практически одинакова. По-видимому, наиболее эффективная на настоящий момент система экспрессии делеционного варианта FVIII получена при помощи специальных гибридных клеток человека НКВ11; в случае делеционного варианта FVIII 90-142-80 (табл. 3) удельная продуктивность клональных линий составила 5–10 МЕ/млн клеток/день [88, 152].

Изучение уровней экспрессии генов вариантов FVIII с делецией только С-концевых частей В-домена показало, что вариант FVIII, содержащий первые 226 аминокислот В-домена и шесть сайтов N-гликозилирования (вариант 226aa/N6), секретируется клетками линии CHO в 5 раз более эффективно, чем FVIII с делецией полного В-домена. Этот эффект можно объяснить улучшением транспорта белка-предшественника из ЭПР в аппарат Гольджи [127] (по сравнению с полноразмерной формой)

и уменьшением адсорбции секретированного FVIII на поверхность мембраны клеток-продуцентов [124] (по сравнению с обычными делеционными вариантами). Продуктивность линий-продуцентов варианта 226/N6 на основе клеток CHO достигла 11 МЕ/мл без индукции экспрессии целевого гена и 15.7 МЕ/мл при использовании среды, содержащей сыворотку [52].

### ФАКТОРЫ, ОГРАНИЧИВАЮЩИЕ ПРОДУКТИВНОСТЬ СИСТЕМ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ FVIII

Сильное понижение уровня транскрипции гибридных генов, содержащих открытую рамку считывания (ОРС) *FVIII*, впервые описали при культивировании ретровирусных векторов [153, 154]. Присутствие ОРС *FVIII* не изменяло уровень инициации транскрипции, однако фрагмент ОРС размером 1.2 т.п.н. вызывал снижение эффективности элонгации транскрипции в 30–100 раз. Обнаруженный эффект зависел от ориентации, в существенной степени от положения и был делокализованным – удаление различных частей исследуемого фрагмента ОРС вызывало частичное восстановление уровня элонгации транскрипции. Позднее в другой области ОРС *FVIII* выявили ориентационно-независимый транскрипционный сайленсер длиной 305 п.н. [155], активность которого подавлялась бутиратом натрия [156], что позволяло увеличить уровень секреции FVIII в культуре клеток приблизительно в 6 раз. Наличие такого управляемого элемента контроля уровня транскрипции в ОРС *FVIII* препятствует получению эффективных терапевтических вирусных векторов, но представляет определенные преимущества при биосинтезе FVIII в культивируемых клетках. Стресс, вызываемый процессингом предшественника FVIII, может быть ограничен подавлением транскрипции гена *FVIII* в делящейся культуре, а последующая индукция экспрессии *FVIII* при добавлении бутирата натрия подвергает стрессу только плотную неделяющуюся культуру клеток.

Оптимизацию кодонов кодирующей области мРНК *FVIII* исследовали в работе [157]. Оказалось, что замена части кодонов на наиболее частотные для *Homo sapiens* и одновременное удаление из кодирующей области мРНК внутренних ТАТА-боксов, СН1-сайтов, сайтов связывания рибосом, криптических сайтов сплайсинга и т.п. привело к увеличению уровня FVIII:С в 7–30 раз. Одновременно с этим для делеционного варианта FVIII BDD SQ наблюдалось увеличение отношения концентрации антигена FVIII к его прокагулянтной активности (отношение FVIII:Ag к FVIII:С) с  $1.27 \pm 0.3$  до  $2.35 \pm 0.49$ , что может указывать на достижение практического предела продуктивности использованной линии клеток 293

и появлению в культуральной среде нефункционального белка.

Предшественник FVIII в просвете ЭПР образует прочный комплекс с главным шапероном BiP [54], одним из основных участников сигнального пути UPR. Сверхэкспрессия гена *FVIII* индуцирует транскрипцию гена *BiP* [56], причем уровень BiP в клетке обратно пропорционален уровню секреции фактора FVIII в довольно широком диапазоне [13, 158]. Подавление экспрессии BiP при помощи коротких шпилечных РНК (shRNA) увеличивало уровень секреции FVIII человека [159] приблизительно в 2 раза при одновременном снижении числа копий мРНК *FVIII* на ~65%. Аналогичный эффект наблюдался и при сверхэкспрессии гена *XBP1*, продукт которого также участвует в UPR.

Установлено, что сверхэкспрессия гена шаперона *Hsp70* уменьшает индукцию апоптоза в плотной культуре продуцентов FVIII на основе клеток линии ВНК и увеличивает уровень секреции FVIII [160]. Аналогичные данные получены при сверхэкспрессии антиапоптотических генов *Aven* и *E1B-19K* [72]. В то же время в линии гибридных клеток человека НКВ11, продуцирующих FVIII, не наблюдали значимых изменений уровня экспрессии *Hsp70* и антиапоптотических генов *Bcl-2*, *Bcl-xL* среди клонов с различным уровнем секреции FVIII [152]. Эти данные свидетельствуют о том, что такой путь антиапоптотического реинжиниринга продуцентов FVIII может быть эффективен только для сверхплотных культур клеток ВНК.

Подавление окислительного стресса в ЭПР и вызываемых им UPR и апоптоза в клетках СНО, сверхэкспрессирующих FVIII, при помощи антиоксидантов показано в работе [51]. Введение в культуральную среду антиоксиданта бутилата гидроксанизола одновременно с бутиратом натрия – индуктором экспрессии гена *FVIII*, позволило увеличить уровень секреции полноразмерного FVIII в 4 раза. Проявления окислительного стресса зафиксированы и для варианта FVIII с полной делецией В-домена, но не варианта 226/N6.

Повышение секреции FVIII при ограничении интенсивности UPR, окислительного стресса и апоптоза клеток-продуцентов может быть связано с изменением уровня адсорбции FVIII на внешнюю мембрану клеток. В клетках СНО, секретирующих полноразмерный FVIII, концентрация FVIII в бессывороточном супернатанте возрастала в 4 раза при добавлении к культуральной среде vWF свиньи [77], т.е. не менее  $\frac{3}{4}$  всего секретируемого FVIII в отсутствие vWF оставалось связанным с мембраной клеток. FVIII преимущественно связывается с фосфолипидными мембранами, содержащими фосфатидилсерин.

Для мембран активированных тромбоцитов константы диссоциации FVIII, FVIII BDD SQ и FVIIIa составляют 10.4, 5.1, 1.7 нМ соответственно [161]. Увеличение адсорбции FVIII на мембрану апоптотических клеток (также содержащую повышенную долю фосфатидилсерина) показано методом проточной цитофлуориметрии – подавление апоптоза клеток-продуцентов путем сверхэкспрессии гена *Hsp70* приводило к падению уровня адсорбции полноразмерного FVIII мембраной и увеличению его концентрации в культуральной среде [161]. В системах экспрессии вариантов гена FVIII с делецией В-домена адсорбция на мембране клеток носит более выраженный характер и может превышать 90% в случае варианта N0 (идентичен N8), при этом частичная делеция В-домена вместо полной позволяет уменьшить адсорбцию до ~50% при одновременном падении общего уровня экспрессии FVIII приблизительно вдвое [124]. Потери секретированного FVIII N0 на мембране клеток-продуцентов также могут быть уменьшены блокированием его взаимодействия с фосфатидилсерином при добавлении к культуральной среде vWF, аннексина V или о-фосфо-L-серина [162].

### ТРАНСГЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Системы экспрессии рекомбинантных белков системы гемостаза на основе культивируемых клеток потенциально возможно полностью заменить технологиями получения этих белков в молоке трансгенных животных. Примером удачной реализации такого подхода является антитромбин III, для получения которого выведены трансгенные козы с продуктивностью антитромбина III более 1 г/л, и разработаны промышленные процессы очистки целевого белка [163]. Уровень продукции FIX в молоке трансгенных свиней был значительно ниже [164], что обычно связывают с недостаточным уровнем  $\gamma$ -карбоксилирования продукта. Основными ограничителями продуктивности трансгенных животных, секретирующих FVIII в молоко, считаются стабильность полипептида и правильность процессинга одноцепочечной формы до гетеродимера [165]. Функционально активный полноразмерный FVIII получали в молоке мышей [166], кроликов [167], овец [168] и свиней [169], однако во всех случаях уровень секреции продукта не представлял практического интереса (табл. 4). При использовании делеционного варианта FVIII 226/N6 и коэкспрессии фактора фон Виллебранда уровень FVIII:С в молоке трансгенной мыши достиг 678 МЕ/мл, что указывает на возможность получения крупных трансгенных животных, секретирующих в молоко промышленно значимые количества FVIII, однако одновременное введение двух транскрипционно активных трансгенов в геном

Таблица 4. Основные свойства трансгенных животных, способных секретировать FVIII в молоко

Название	Объем молока, л <sup>*,**</sup>	Оценка максимальной продуктивности, г <sup>*,**</sup>	FVIII:Ag, мкг/мл	FVIII:C, МЕ/мл	Удельная активность, МЕ/мг, [для плазмы 5 000 <sup>+1</sup>	Продуктивность на самку в год, мг/МЕ	Примечания, источник
Мышь	0.0015	0.01–0.02	50.21	13.41	267	0.075 / 20	F1 [166]
			122–183	555–678	3705–4549	0.183–0.275 / 833–1017	Вариант 226/N6 + vWF [165]
Кролик	2–5	20	0.117***	0.521	4500***	0.234–0.585 / 1042–2605	F1 [167]
Овца	200–500	2500	н/о	0.02–0.03****	н/о	н/о / 4000–15000	F1 [168]
Свинья	200–400	1500	2.66	0.62	233	532–1064 / 124 000–248 000	F1 [169]

F1 – полноразмерный FVIII.

\*В год на одну самку.

\*\*По данным [170] и [171].

\*\*\*В цитируемой работе содержание FVIII:Ag приведено в мкг/мл, что, по-видимому, является опечаткой, в таблицу данные внесены как нг/мл.

\*\*\*\*В цитируемой работе FVIII:C измерен против стандарта природного FVIII и выражен в нг/мл, в таблицу внесены данные в МЕ/мл в предположении удельной активности стандарта 5000 МЕ/мг.

сельскохозяйственных животных потребует весьма значительных усилий.

#### ВАРИАНТЫ FVIII ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Несмотря на то что лекарственные препараты рекомбинантного FVIII значительно уменьшили потенциальный риск передачи вирусных инфекций, современная заместительная терапия гемофилии А остается весьма несовершенной, не обеспечивая больным нормальное качество жизни. Среди причин ограниченной эффективности заместительной терапии – иммуногенность вводимого FVIII, приводящая к появлению ингибиторных антител, и нестабильность FVIII в кровотоке, требующая проведения инъекций каждые 2–3 дня при его профилактическом применении. Поскольку риск появления ингибиторных антител к FVIII определяется, в том числе и количеством проведенных инъекций, получение производных FVIII с увеличенным временем полужизни способствовало бы решению обеих проблем.

Среди направлений изучения производных FVIII пролонгированного действия можно выделить получение конъюгатов FVIII с гидрофильными полимерами, внесение точечных мутаций, получение слитых белков и разработку гибридных вариантов FVIII человека и свиньи.

Конъюгация терапевтических белков с молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ) обычно позволяет в несколько раз увеличить время их циркуляции

в кровотоке, а в ряде случаев уменьшает иммуногенность и предохраняет от протеолитического распада. При этом ненаправленное присоединение молекул ПЭГ к терапевтическому белку может привести к его инактивации [172], а в случае FVIII блокирование его взаимодействия с vWF может привести и к сильному уменьшению времени полураспада. Исследована возможность направленного присоединения молекул ПЭГ к непарным остаткам цистеина, введенным в различные домены делеционного варианта FVIII BDD SQ сайт-направленным мутагенезом [173] (рис. 8). В случае варианта FVIII, содержащего два дополнительных остатка цистеина в положениях 129 и 1804, конъюгированных с молекулами ПЭГ 60 кДа (вариант BDD FVIII 60 kDa di-PEG-L491C/K1804C, рис. 8А), наблюдали увеличение выживаемости нокаутных мышей после рассечения хвостовой вены с 60% для интактного FVIII до 86% [173]. Ненаправленное присоединение молекул ПЭГ к полноразмерному FVIII по боковым аминокислотным группам остатков лизина также позволило получить конъюгат (код ВАХ 855, рис. 8Б) со средней степенью присоединения остатков ПЭГ (2 : 1), неизменной прокоагулянтной активностью и временем жизни в кровотоке, увеличенным примерно вдвое [174].

Вследствие того, что интактный FVIII циркулирует в кровотоке в составе мультимерного высокомолекулярного комплекса с vWF, увеличение времени полураспада рекомбинантного FVIII путем создания

А		<p><b>BDD FVIII 60 кДа di-PEG- L491C/ K1804C</b> Увеличение времени полувыведения при сохранении удельной активности за счет сайт-специфической модификации</p>
Б		<p><b>BAX-855</b> Увеличение времени полувыведения при сохранении удельной активности за счет преимущественной модификации остатков в В-домене</p>
В		<p><b>FVIII-Fc</b> Удержание в кровотоке за счет обратимого связывания FcRn-рецептора</p>
Г		<p><b>IR8</b> FVIIIa устойчив к инактивации APC, но не связывается с vWF</p>
Д		<p><b>FVIII C664–C1826, C662–C1828</b> Стабилизация FVIIIa за счет невозможности инактивации диссоциацией A2-домена</p>
Е		<p><b>E1984V</b> Стабилизация FVIIIa за счет увеличения аффинности свободного домена A2 к домену A3</p>
Ж		<p><b>R489A R484A P492A</b> Потеря доминантного эпитопа аллоантител при сохранении функциональных свойств</p>
З		<p><b>HP32</b> Замена основных эпитопов аллоантител на гомологичные участки FVIII свиньи</p>
И		<p><b>FIX V181I/ K265T/ I383V</b> Увеличение активности FIXa, достаточное для прямой активации FX</p>
К		<p><b>hBS23</b> Имитация FVIIIa биспецифическим антителом к FIXa и FX. Комплекс удерживается на мембране за счет Gla-доменов FIXa и FX</p>

**Рис. 8.** Варианты и функциональные аналоги FVIII пролонгированного действия. Спирали – ковалентно присоединенные группы ПЭГ, прерывистые линии – неизвестные точки конъюгации, стрелка – нековалентное взаимодействие, волнистые линии – блокирование взаимодействий. На панели 3 зеленым обозначены участки FVIII свиньи



белков, слитых с долгоживущими белками плазмы крови, например с сывороточным альбумином, представляется неперспективным. Одновременно с этим, соединение в рамке с FVIII доменов других белков, специфически защищающих их от удаления из циркуляции, может значительно увеличить стабильность FVIII. Так, белок FVIII-Fc-домен иммуноглобулинов (FVIII-Fc, *рис. 8B*) в опытах на нокаутных мышах и собаках с моделью гемофилии А вдвое дольше защищал от неконтролируемого кровотечения, чем интактный FVIII [175]. Пролонгированное действие FVIII-Fc полностью определялось взаимодействием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Клинические исследования FVIII-Fc, проведенные на 16 пациентах, показали увеличение времени нахождения FVIII-Rc в кровотоке (время от введения препарата до падения уровня FVIII:C ниже 1%) в 1.53–1.68 раза [176]. Следует отметить, что обычно профилактическое применение препаратов FVIII предполагает проведение трех инъекций в неделю, при этом для использования одной инъекции в неделю необходимо, чтобы продолжительность действия FVIII увеличилась по крайней мере в 2 раза [177]. Таким образом увеличение продолжительности действия модифицированных вариантов FVIII приблизительно в 1.5 раза по сравнению с интактным FVIII может несколько снизить риск кровотечений при существующих режимах профилактики (так называемая «проблема третьего дня»), но не перейти к более редким инъекциям.

Изменение свойств FVIII путем точечного мутагенеза описано в нескольких независимых работах, однако ни один из мутантных белков (мутеинов) не проходил клинических испытаний. Введение трех точечных замен R336I/R562K/R740A в ген делеционного варианта FVIII 741–1689 (вариант IR8, *рис. 8Г*) позволило получить белок с нормальной прокоагулянтной активностью, потерей аффинности к vWF и высокой устойчивостью к протеолитической инактивации FVIIIa активированным белком С [178], однако при применении данного варианта гена для направленной экспрессии FVIII на поверхности тромбоцитов существенных отличий в остановке кровотечений у мышей с нокаутом не отмечалось [179].

Введение пары остатков цистеина в пространственно сближенные участки доменов А2 и А3 позволяет установить дисульфидную связь между ними, стабилизировать активированный FVIII и таким образом увеличить его прокоагулянтную активность [180]. Мутеины делеционного варианта FVIII, содержащие пары цистеинов С664–С1826 или С662–С1828 (*рис. 8Д*), обладали десятикратно увеличенной удельной активностью в опытах *in vitro* по сравнению с интактным FVIII [181].

Стабильность FVIIIa также можно повысить путем замены аминокислот поверхностей интерфейсов между доменами А2, А1 и А3. Точечная замена E1984V (*рис. 8E*) привела к увеличению времени распада активированного FVIII в 4–8 раз при сохранении нормальной прокоагулянтной активности [182].

Большинство ингибиторных антител, появляющихся у больных гемофилией А, направлено к эпитопам в составе доменов А2 и С2, причем антитела к домену А2 в основном реагируют с коротким участком 484–508, поэтому замена нескольких аминокислот в этой области FVIII может снизить его иммуногенность. Тройная замена R484A/R489A/P492A (*рис. 8Ж*) оказалась достаточной для снижения среднего уровня ингибитора с 670 до 310 ед./мл у нокаутных мышей, получивших семь последовательных инъекций FVIII с интервалом 14 дней [183].

С использованием серии гибридных молекул FVIII с делетированным В-доменом 741–1648, содержащих перемежающиеся участки FVIII свиньи и человека, в опытах *in vitro* показано, что замена участка 484–508 домена А2 FVIII человека на гомологичный участок FVIII свиньи и полная замена доменов А3 и С2 человека соответствующими доменами FVIII свиньи (вариант HP32, *рис. 8З*) позволяют получить молекулу FVIII, устойчивую к ингибиторному действию большинства антител, выделенных от больных гемофилией А [184]. По этой причине проходящий клинические испытания [185] рекомбинантный FVIII свиньи с делецией В-домена (вариант OBI-1) может быть в перспективе заменен на гибридную молекулу, обладающую меньшей иммуногенностью, чем ксеногенный FVIII свиньи [186], но не несущую иммунодоминантные эпитопы FVIII человека.

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АНАЛОГИ FVIII

Поскольку функция FVIIIa может быть сведена к увеличению активности FIXa, высокоактивный аналог FIXa, способный генерировать достаточные количества тромбина, позволит обеспечить эффективное свертывание крови без участия FVIII. Модифицированный таким образом FIX, в отличие от FVIII, может использоваться и при ингибиторной форме гемофилии А. Введение мышам с нокаутом гена FVIII генотерапевтической плазмиды, кодирующей мутеин FIX с тройной заменой V181I, K265T, I383V, привело к улучшению показателей свертываемости крови [187], что указывает на возможность восстановления функции гемостаза при гемофилии А без использования препаратов FVIII (*рис. 8И*). Тензный комплекс также можно реконструировать, заменив молекулу FVIIIa на биспецифическое антитело, связывающее FIXa и FX. Такое антитело было отобрано методами высокопроизводительного скрининга из 40000 моле-

кул, составленных из фрагментов моноклональных антител к FIX и FX [188]. После оптимизации структуры ведущих молекул получено биспецифическое гуманизированное антитело hBS23, способное увеличивать каталитическую эффективность FIXa в 19800 раз (272000 раз для FVIII) за счет понижения  $K_m$  реакции активации FX в 20 раз и повышения  $k_{cat}$  в 1000 раз (рис. 8К). Однократная инъекция 0.3 мг/кг hBS23 макакам, служащим моделью приобретенной гемофилии А, обеспечивала практически такой же контроль кровотечения, как и терапия свинным FVIII.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основой эффективного контроля кровотечений при гемофилии А являются регулярная заместительная терапия препаратами FVIII и переход к профилактике кровотечений в педиатрической практи-

ке. Поскольку современное состояние исследований и разработок производных FVIII пролонгированного действия не позволяет рассчитывать на быстрое появление существенно усовершенствованных лекарственных препаратов, создание новых линий-продуцентов FVIII с учетом накопленных знаний о структуре FVIII и факторах, влияющих на уровень его биосинтеза и секреции, может позволить многократно увеличить объем производства. Можно предположить, что простое увеличение объема производства биосимилярных препаратов рекомбинантного FVIII «третьего поколения» позволит увеличить объем заместительной терапии при гемофилии А при сохранении текущих затрат, т.е. улучшить качество жизни больных и ее продолжительность без перераспределения в их пользу ограниченных ресурсов здравоохранения. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antonarakis S.E., Kazazian H.H., Tuddenham E.G. // *Hum. Mutat.* 1995. V. 5. № 1. P. 1–22.
- Kemball-Cook G. Haemophilia A Mutation Database. University College London. 1994. <http://hadb.org.uk>
- Payne A.B., Miller C.H., Kelly F.M., Michael Soucie J., Craig Hooper W. // *Hum. Mutat.* 2013. V. 34. № 2. P. E2382–2391.
- Blumel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H.H., Lower J., Eis-Hubinger A.M. // *Transfusion.* 2002. V. 42. № 11. P. 1473–1481.
- Yokozaki S., Fukuda Y., Nakano I., Katano Y., Toyoda H., Takamatsu J. // *Blood.* 1999. V. 94. № 10. P. 3617.
- Evatt B.L. // *Haemophilia.* 1998. V. 4. № 4. P. 628–633.
- Brooks A.R., Harkins R.N., Wang P., Qian H.S., Liu P., Rubanyi G.M. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. № 4. P. 395–404.
- Kim M., O'Callaghan P.M., Droms K.A., James D.C. // *Biotechnol. Bioengin.* 2011. V. 108. № 10. P. 2434–2446.
- Sabatino D.E., Nichols T.C., Merricks E., Bellinger D.A., Herzog R.W., Monahan P.E. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012. V. 105. P. 151–209.
- Gitschier J., Wood W.I., Goralka T.M., Wion K.L., Chen E.Y., Eaton D.H., Vehar G.A., Capon D.J., Lawn R.M. // *Nature.* 1984. V. 312. № 5992. P. 326–330.
- Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., Sultzman L.A., Buecker J.L., Pittman D.D., Kaufman R.J., Brown E., Shoemaker C., Orr E.C., et al. // *Nature.* 1984. V. 312. № 5992. P. 342–347.
- Cho M.S., Tran V.M. // *Virology.* 1993. V. 194. № 2. P. 838–842.
- Dunne M.J., Kane C., Shepherd R.M., Sanchez J.A., James R.F., Johnson P.R., Aynsley-Green A., Lu S., Clement J.P., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 336. № 10. P. 703–706.
- Stel H.V., van der Kwast T.H., Veerman E.C. // *Nature.* 1983. V. 303. № 5917. P. 530–532.
- Do H., Healey J.F., Waller E.K., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 28. P. 19587–19592.
- Hollestelle M.J., Thinnis T., Crain K., Stiko A., Kruijft J.K., van Berkel T.J., Loskutoff D.J., van Mourik J.A. // *Thromb. Haemost.* 2001. V. 86. № 3. P. 855–861.
- Vehar G.A., Keyt B., Eaton D., Rodriguez H., O'Brien D.P., Rotblat F., Oppermann H., Keck R., Wood W.I., Harkins R.N., et al. // *Nature.* 1984. V. 312. № 5992. P. 337–342.
- Wood W.I., Capon D.J., Simonsen C.C., Eaton D.L., Gitschier J., Keyt B., Seeburg P.H., Smith D.H., Hollingshead P., Wion K.L., et al. // *Nature.* 1984. V. 312. № 5992. P. 330–337.
- Kjalke M., Heding A., Talbo G., Persson E., Thomsen J., Ezban M. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 234. № 3. P. 773–779.
- Donath M.J., Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 240. № 2. P. 365–372.
- Colman R.W. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2012. 1578 p.
- Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. // *Blood.* 1998. V. 92. № 11. P. 3983–3996.
- Andrew P.J., Auer M., Lindley I.J., Kauffmann H.F., Kungl A.J. // *FEBS Lett.* 1997. V. 408. № 3. P. 319–323.
- Pemberton S., Lindley P., Zaitsev V., Card G., Tuddenham E.G., Kemball-Cook G. // *Blood.* 1997. V. 89. № 7. P. 2413–2421.
- McCune J.S., Liles D., Lindley C. // *Pharmacotherapy.* 1997. V. 17. № 4. P. 822–826.
- Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D., Coccain-Bousquet M. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. № 17. P. 5282–5287.
- Harvey M.J., Cauvin A., Dale M., Lindley S., Ballabio R. // *J. Small Anim. Pract.* 1997. V. 38. № 8. P. 336–339.
- Molinari M., Calanca V., Galli C., Lucca P., Paganetti P. // *Science.* 2003. V. 299. № 5611. P. 1397–1400.
- Liu M. L., Shen B.W., Nakaya S., Pratt K.P., Fujikawa K., Davie E.W., Stoddard B.L., Thompson A.R. // *Blood.* 2000. V. 96. № 3. P. 979–987.
- Larocca D., Peterson J.A., Urrea R., Kuniyoshi J., Bistrain A.M., Ceriani R.L. // *Cancer Res.* 1991. V. 51. № 18. P. 4994–4998.
- Lin L., Huai Q., Huang M., Furie B., Furie B.C. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371. № 3. P. 717–724.
- Johnson J.D., Edman J.C., Rutter W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 12. P. 5677–5681.
- Stubbs J.D., Lekutis C., Singer K. L., Bui A., Yuzuki D., Srinivasan U., Parry G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 21. P. 8417–8421.
- Shima M., Scandella D., Yoshioka A., Nakai H., Tanaka I., Kamisue S., Terada S., Fukui H. // *Thromb. Haemost.* 1993. V. 69. № 3. P. 240–246.
- Elder B., Lakich D., Gitschier J. // *Genomics.* 1993. V. 16. № 2. P. 374–379.

36. Pittman D.D., Alderman E.M., Tomkinson K.N., Wang J.H., Giles A.R., Kaufman R.J. // *Blood*. 1993. V. 81. № 11. P. 2925–2935.
37. Pittman D.D., Marquette K.A., Kaufman R.J. // *Blood*. 1994. V. 84. № 12. P. 4214–4225.
38. Cho M.S., Yee H., Brown C., Jeang K.T., Chan S. // *Cytotechnology*. 2001. V. 37. № 1. P. 23–30.
39. Wakabayashi H., Koszelak M.E., Mastro M., Fay P.J. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. № 34. P. 10293–10300.
40. Tagliavacca L., Moon N., Dunham W.R., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 43. P. 27428–27434.
41. Ngo J.C., Huang M., Roth D.A., Furie B. C., Furie B. // *Structure*. 2008. V. 16. № 4. P. 597–606.
42. Shen B.W., Spiegel P.C., Chang C.H., Huh J.W., Lee J.S., Kim J., Kim Y.H., Stoddard B.L. // *Blood*. 2008. V. 111. № 3. P. 1240–1247.
43. Fay P.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1988. V. 262. № 2. P. 525–531.
44. Wise R.J., Dorner A.J., Krane M., Pittman D.D., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 32. P. 21948–21955.
45. Wakabayashi H., Schmidt K.M., Fay P.J. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 26. P. 8485–8492.
46. Wakabayashi H., Zhen Z., Schmidt K.M., Fay P.J. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 1. P. 145–153.
47. Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Lindley P.F., Fox P.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 21. P. 11546–11551.
48. Wakabayashi H., Freas J., Zhou Q., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 13. P. 12677–12684.
49. Kaufman R.J., Wasley L.C., Dorner A.J. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 13. P. 6352–6362.
50. Pipe S.W., Morris J.A., Shah J., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 14. P. 8537–8544.
51. Malhotra J.D., Miao H., Zhang K., Wolfson A., Pennathur S., Pipe S.W., Kaufman R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 47. P. 18525–18530.
52. Selvaraj S.R., Scheller A.N., Miao H.Z., Kaufman R.J., Pipe S.W. // *J. Thromb. Haemost.* 2012. V. 10. № 1. P. 107–115.
53. Hagiwara M., Nagata K. // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. V. 16. № 10. P. 1119–1128.
54. Liles D., Landen C.N., Monroe D.M., Lindley C.M., Read M.S., Roberts H.R., Brinkhous K.M. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 77. № 5. P. 944–948.
55. Malhi H., Kaufman R.J. // *J. Hepatol.* 2011. V. 54. № 4. P. 795–809.
56. Dorner A.J., Wasley L.C., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 34. P. 20602–20607.
57. Brown H.C., Gangadharan B., Doering C.B. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 27. P. 24451–24457.
58. Murphy M.E., Lindley P.F., Adman E.T. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. № 4. P. 761–770.
59. Swaroop M., Moussalli M., Pipe S.W., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 39. P. 24121–24124.
60. Tagliavacca L., Wang Q., Kaufman R.J. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 8. P. 1973–1981.
61. Moussalli M., Pipe S.W., Hauri H.P., Nichols W.C., Ginsburg D., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 46. P. 32539–32542.
62. Zakas P.M., Gangadharan B., Almeida-Porada G., Porada C.D., Spencer H.T., Doering C.B. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. P. e49481.
63. Nogami K., Wakabayashi H., Schmidt K., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 3. P. 1634–1641.
64. Zhang B., McGee B., Yamaoka J.S., Guglielmo H., Downes K.A., Minoldo S., Jarchum G., Peyvandi F., de Bosch N.B., Ruiz-Saez A., et al. // *Blood*. 2006. V. 107. № 5. P. 1903–1907.
65. Fay P.J., Smudzin T.M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 19. P. 13246–13250.
66. White G.C., 2nd, McMillan C.W., Kingdon H.S., Shoemaker C.B. // *N. Engl. J. Med.* 1989. V. 320. № 3. P. 166–170.
67. Lee D.C., Miller J.L., Petteway S.R., Jr. // *Haemophilia*. 2002. V. 8. Suppl 2. P. 6–9.
68. Yoshioka A. // *Textbook of Hemophilia*. New York: Wiley-Blackwell, 2010. P. 146–152.
69. Zhang B., Kaufman R.J., Ginsburg D. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 27. P. 25881–25886.
70. Jankowski M.A., Patel H., Rouse J.C., Marzilli L.A., Weston S.B., Sharpe P.J. // *Haemophilia*. 2007. V. 13. № 1. P. 30–37.
71. Regan L.M., O'Brien L.M., Beattie T.L., Sudhakar K., Walker F.J., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 8. P. 3982–3987.
72. Nivitchanyong T., Martinez A., Ishaque A., Murphy J.E., Konstantinov K., Betenbaugh M.J., Thrift J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 98. № 4. P. 825–841.
73. Nogami K., Wakabayashi H., Fay P.J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 19. P. 16502–16509.
74. Leyte A., van Schijndel H.B., Niehrs C., Huttner W.B., Verbeet M.P., Mertens K., van Mourik J.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 2. P. 740–746.
75. Higuchi M., Wong C., Kochhan L., Olek K., Aronis S., Kasper C.K., Kazazian H.H., Jr., Antonarakis S.E. // *Genomics*. 1990. V. 6. № 1. P. 65–71.
76. Michnick D.A., Pittman D.D., Wise R.J., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 31. P. 20095–20102.
77. Adamson R. // *Ann. Hematol.* 1994. V. 68. Suppl 3. P. S9–14.
78. Leyte A., Verbeet M.P., Brodniewicz-Proba T., van Mourik J.A., Mertens K. // *Biochem. J.* 1989. V. 257. № 3. P. 679–683.
79. Saenko E.L., Scandella D. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 29. P. 18007–18014.
80. Jacquemin M., Benhida A., Peerlinck K., Desqueper B., Vander Elst L., Lavend'homme R., d'Oiron R., Schwaab R., Bakkus M., Thielemans K., et al. // *Blood*. 2000. V. 95. № 1. P. 156–163.
81. Hamer R.J., Koedam J.A., Beeser-Visser N.H., Sixma J.J. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 167. № 2. P. 253–259.
82. Hill-Eubanks D.C., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 29. P. 17854–17858.
83. Koedam J.A., Hamer R.J., Beeser-Visser N.H., Bouma B.N., Sixma J.J. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 189. № 2. P. 229–234.
84. Koedam J.A., Meijers J.C., Sixma J.J., Bouma B.N. // *J. Clin. Invest.* 1988. V. 82. № 4. P. 1236–1243.
85. Fay P.J., Coumans J.V., Walker F.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266; 4. P. 2172–2177.
86. Nogami K., Shima M., Nishiya K., Hosokawa K., Saenko E.L., Sakurai Y., Shibata M., Suzuki H., Tanaka I., Yoshioka A. // *Blood*. 2002. V. 99. № 11. P. 3993–3998.
87. Nesheim M., Pittman D.D., Giles A.R., Fass D.N., Wang J.H., Slonosky D., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 27. P. 17815–17820.
88. Cho M.S., Yee H., Brown C., Mei B., Mirenda C., Chan S. // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. № 1. P. 229–232.
89. Gilbert G.E., Drinkwater D., Barter S., Clouse S.B. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 22. P. 15861–15868.
90. Gilles J.G., Jacquemin M.G., Saint-Remy J.M. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 78. № 1. P. 641–646.
91. Franchini M., Lippi G. // *Blood*. 2008. V. 112. № 2. P. 250–255.
92. Tuddenham E.G., McVey J.H. // *Haemophilia*. 1998. V. 4. № 4. P. 543–545.
93. Gouw S.C., van den Berg H.M., Oldenburg J., Astermark J., de Groot P.G., Margaglione M., Thompson A.R., van Heerde W., Boekhorst J., Miller C.H., le Cessie S., van der Bom J.G. // *Blood*. 2012. V. 119. № 12. P. 2922–2934.



94. Towfighi F, Gharagozlou S, Sharifian R.A., Kazemnejad A., Esmailzadeh K, Managhchi M.R., Shokri F. // *Acta Haematol.* 2005. V. 114. № 2. P. 84–90.
95. Green D. // *Haemophilia.* 2011. V. 17. № 6. P. 831–838.
96. Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C., Stieltjes N., Pashov A., Sultan Y., Hoebeke J., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 9. P. 1044–1047.
97. Lacroix-Desmazes S, Bayry J., Misra N., Horn M.P., Villard S., Pashov A., Stieltjes N., d'Oiron R., Saint-Remy J.M., Hoebeke J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 346. № 9. P. 662–667.
98. Lenting P.J., Donath M.J., van Mourik J.A., Mertens K. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 10. P. 7150–7155.
99. Duffy E.J., Parker E.T., Mutucumarana V.P., Johnson A.E., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 24. P. 17006–17011.
100. Curtis J.E., Helgerson S.L., Parker E.T., Lollar P. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 8. P. 6246–6251.
101. Bovenschen N., Boertjes R.C., van Stempvoort G., Voorberg J., Lenting P.J., Meijer A. B., Mertens K. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 11. P. 9370–9377.
102. Gilbert G.E., Furie B.C., Furie B. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 2. P. 815–822.
103. Kemball-Cook G., Barrowcliffe T.W. // *Thromb. Res.* 1992. V. 67. № 1. P. 57–71.
104. Cho M.S., Chan S.Y. Vectors having terminal repeat sequence of Epstein-Barr virus: Patent of USA № 6180108. 2001 (<http://www.google.com/patents/US6180108>).
105. Saenko E.L., Scandella D., Yakhyaev A.V., Greco N.J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 43. P. 27918–27926.
106. Arai M., Scandella D., Hoyer L.W. // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 83. № 6. P. 1978–1984.
107. Eaton D., Rodriguez H., Vehar G.A. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 2. P. 505–512.
108. Lollar P., Knutson G.J., Fass D.N. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 27. P. 8056–8064.
109. Fay P.J., Haidaris P.J., Smudzin T.M. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 14. P. 8957–8962.
110. Hockin M.F., Jones K.C., Everse S.J., Mann K.G. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 21. P. 18322–18333.
111. Saenko E.L., Yakhyaev A.V., Mikhailenko I., Strickland D.K., Sarafanov A.G. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 53. P. 37685–37692.
112. Lenting P.J., Neels J.G., van den Berg B.M., Clijsters P.P., Meijerman D.W., Pannekoek H., van Mourik J.A., Mertens K., van Zonneveld A.J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 34. P. 23734–23739.
113. Turecek P.L., Schwarz H.P., Binder B.R. // *Blood.* 2000. V. 95. № 11. P. 3637–3638.
114. Sarafanov A.G., Ananyeva N.M., Shima M., Saenko E.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 15. P. 11970–11979.
115. Schwartz R.S., Abildgaard C.F., Aledort L.M., Arkin S., Bloom A.L., Brackmann H.H., Brettler D.B., Fukui H., Hilgartner M.W., Inwood M.J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1990. V. 323. № 26. P. 1800–1805.
116. Josephson C.D., Abshire T. // *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2004. V. 2. № 7. P. 441–446.
117. Gomperts E., Lundblad R., Adamson R. // *Transfus. Med. Rev.* 1992. V. 6. № 4. P. 247–251.
118. Toole J.J., Pittman D.D., Orr E.C., Murtha P., Wasley L.C., Kaufman R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 16. P. 5939–5942.
119. Lind P., Larsson K., Spira J., Sydow-Backman M., Almstedt A., Gray E., Sandberg H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 232. № 1. P. 19–27.
120. Sandberg H., Almstedt A., Brandt J., Gray E., Holmquist L., Oswaldsson U., Sebring S., Mikaelsson M. // *Thromb. Haemost.* 2001. V. 85. № 1. P. 93–100.
121. Meulien P., Faure T., Mischler F., Harrer H., Ulrich P., Bouderbala B., Dott K., Sainte Marie M., Mazurier C., Wiesel M. L., et al. // *Protein Eng.* 1988. V. 2. № 4. P. 301–306.
122. Eaton D.L., Wood W.I., Eaton D., Hass P.E., Hollingshead P., Wion K., Mather J., Lawn R.M., Vehar G.A., Gorman C. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 26. P. 8343–8347.
123. Yonemura H., Sugawara K., Nakashima K., Nakahara Y., Hamamoto T., Mimaki I., Yokomizo K., Tajima Y., Masuda K., Imaizumi A., et al. // *Protein Eng.* 1993. V. 6. № 6. P. 669–674.
124. Kolind M.P., Norby P.L., Flintegaard T.V., Berchtold M.W., Johnsen L.B. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 147. № 3–4. P. 198–204.
125. Thim L., Vandahl B., Karlsson J., Klausen N.K., Pedersen J., Krogh T.N., Kjalke M., Petersen J.M., Johnsen L.B., Bolt G., Norby P.L., Steenstrup T.D. // *Haemophilia.* 2010. V. 16. № 2. P. 349–359.
126. Sandberg H., Kannicht C., Stenlund P., Dadaian M., Oswaldsson U., Cordula C., Walter O. // *Thromb. Res.* 2012. V. 130. № 5. P. 808–817.
127. Miao H.Z., Sirachainan N., Palmer L., Kucab P., Cunningham M.A., Kaufman R.J., Pipe S.W. // *Blood.* 2004. V. 103. № 9. P. 3412–3419.
128. Krishnan S., Kolbe H.V., Lepage P., Faure T., Sauerwald R., de la Salle H., Muller C., Bihoreau N., Paolantonacci P., Roitsch C., et al. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 195. № 3. P. 637–644.
129. Esmo P.C., Kuo H.S., Fournel M.A. // *Blood.* 1990. V. 76. № 8. P. 1593–1600.
130. Herlitschka S.E., Schlokot U., Falkner F.G., Dorner F. // *J. Biotechnol.* 1998. V. 61. № 3. P. 165–173.
131. Fatouros A., Osterberg T., Mikaelsson M. // *Pharm. Res.* 1997. V. 14. № 12. P. 1679–1684.
132. Osterberg T., Fatouros A., Mikaelsson M. // *Pharm. Res.* 1997. V. 14. № 7. P. 892–898.
133. Osterberg T., Fatouros A., Neidhardt E., Warne N., Mikaelsson M. // *Semin. Hematol.* 2001. V. 38. № 2. Suppl 4. P. 40–43.
134. Fijnvandraat K., Berntorp E., ten Cate J.W., Johnsson H., Peters M., Savidge G., Tengborn L., Spira J., Stahl C. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 77. № 2. P. 298–302.
135. Eriksson R.K., Fenge C., Lindner-Olsson E., Ljungqvist C., Rosenquist J., Smeds A.L., ostlin A., Charlebois T., Leonard M., Kelley B.D., Ljungqvist A. // *Semin. Hematol.* 2001. V. 38. № 2. Suppl 4. P. 24–31.
136. Chun B.H., Park S.Y., Chung N., Bang W.G. // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. № 4. P. 315–319.
137. Kelley B.D., Tannatt M., Magnusson R., Hagelberg S., Booth J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 87. № 3. P. 400–412.
138. Lusher J.M., Lee C.A., Kessler C.M., Bedrosian C.L. // *Haemophilia.* 2003. V. 9. № 1. P. 38–49.
139. Smith M.P., Giangrande P., Pollman H., Littlewood R., Kollmer C., Feingold J. // *Haemophilia.* 2005. V. 11. № 5. P. 444–451.
140. Recht M., Nemes L., Matysiak M., Manco-Johnson M., Lusher J., Smith M., Mannucci P., Hay C., Abshire T., O'Brien A., Hayward B., Udata C., Roth D.A., Arkin S. // *Haemophilia.* 2009. V. 15. № 4. P. 869–880.
141. Gruppo R.A., Brown D., Wilkes M.M., Navickis R.J. // *Haemophilia.* 2004. V. 10. № 6. P. 747–750.
142. Gruppo R.A., Brown D., Wilkes M.M., Navickis R.J. // *Haemophilia.* 2004. V. 10. № 5. P. 449–451.
143. Morfini M., Cinotti S., Bellatreccia A., Paladino E., Gringeri A., Mannucci P.M. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. № 11. P. 2283–2289.



144. Johnston A. // *Ther. Drug Monit.* 2012. V. 34. № 1. P. 110–117.
145. Khrenov A.V., Ananyeva N.M., Saenko E.L. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2006. V. 17. № 5. P. 379–388.
146. Lusher J.M. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2002. V. 28. № 3. P. 273–276.
147. Pollmann H., Externest D., Ganser A., Eifrig B., Kreuz W., Lenk H., Pabinger I., Schramm W., Schwarz T.F., Zimmermann R., et al. // *Haemophilia.* 2007. V. 13. № 2. P. 131–143.
148. Gouw S.C., van den Berg H.M., le Cessie S., van der Bom J.G. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 7. P. 1383–1390.
149. Aledort L.M., Navickis R.J., Wilkes M.M. // *J. Thromb. Haemost.* 2011. V. 9. № 11. P. 2180–2192.
150. Lee C.A., Kessler C.M., Varon D., Martinowitz U., Heim M., Vermynen J. // *Haemophilia.* 1998. V. 4. № 4. P. 538–542.
151. Martinowitz U., Bjerre J., Brand B., Klamroth R., Misgav M., Morfini M., Santagostino E., Tiede A., Viuff D. // *Haemophilia.* 2011. V. 17. № 6. P. 854–859.
152. Mei B., Chen Y., Chen J., Pan C.Q., Murphy J.E. // *Mol. Biotechnol.* 2006. V. 34. № 2. P. 165–178.
153. Lynch C.M., Israel D.I., Kaufman R.J., Miller A.D. // *Hum. Gene Ther.* 1993. V. 4. № 3. P. 259–272.
154. Koeberl D.D., Halbert C.L., Krumm A., Miller A.D. // *Hum. Gene Ther.* 1995. V. 6. № 4. P. 469–479.
155. Hoeben R.C., Fallaux F.J., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., van Ormondt H., Briet E., van der Eb A.J. // *Blood.* 1995. V. 85. № 9. P. 2447–2454.
156. Fallaux F.J., Hoeben R.C., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., Briet E., van Ormondt H., van Der Eb A.J. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 8. P. 4264–4272.
157. Ward N.J., Buckley S.M., Waddington S.N., Vandendriessche T., Chuah M.K., Nathwani A.C., McIntosh J., Tuddenham E.G., Kinnon C., Thrasher A.J., et al. // *Blood.* 2011. V. 117. № 3. P. 798–807.
158. Roe S.M., Gormal C., Smith B.E., Baker P., Rice D., Card G., Lindley P. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1997. V. 53. Pt 2. P. 227–228.
159. Lindley E.J. // *EDTNA ERCA J.* 1997. V. 23. № 2. P. 50–51.
160. Ishaque A., Thrift J., Murphy J.E., Konstantinov K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 97. № 1. P. 144–155.
161. Li X., Gabriel D.A. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 35. P. 10760–10767.
162. Kolind M.P., Norby P.L., Berchtold M.W., Johnsen L.B. // *J. Biotechnol.* 2011. V. 151. № 4. P. 357–362.
163. Levy J.H., Weisinger A., Ziomek C.A., Echelard Y. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2001. V. 27. № 4. P. 405–416.
164. Gil G.C., Velander W.H., van Cott K.E. // *Glycobiology.* 2008. V. 18. № 7. P. 526–539.
165. Pipe S.W., Miao H., Butler S.P., Calcaterra J., Velander W.H. // *J. Thromb. Haemost.* 2011. V. 9. № 11. P. 2235–2242.
166. Chen C.M., Wang C.H., Wu S.C., Lin C.C., Lin S.H., Cheng W.T. // *Transgenic Res.* 2002. V. 11. № 3. P. 257–268.
167. Chrenek P., Ryban L., Vetr H., Makarevich A.V., Uhrin P., Paleyanda R.K., Binder B.R. // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. № 3. P. 353–361.
168. Niemann H., Halter R., Carnwath J. W., Herrmann D., Lemme E., Paul D. // *Transgenic Res.* 1999. V. 8. № 3. P. 237–247.
169. Paleyanda R.K., Velander W.H., Lee T.K., Scandella D.H., Gwazdauskas F.C., Knight J.W., Hoyer L.W., Drohan W.N., Lubon H. // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 10. P. 971–975.
170. Dove A. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 10. P. 1045–1048.
171. Panno J. *Animal Cloning: The Science of Nuclear Transfer*, Нью-Йорк: Facts on File, 2004. 176 c.
172. Rostin J., Smeds A.L., Akerblom E. // *Bioconjug. Chem.* 2000. V. 11. № 3. P. 387–396.
173. Mei B., Pan C., Jiang H., Tjandra H., Strauss J., Chen Y., Liu T., Zhang X., Severs J., Newgren J., Chen J., Gu J.M., Subramanyam B., Fournel M.A., Pierce G.F., Murphy J.E. // *Blood.* 2010. V. 116. № 2. P. 270–279.
174. Turecek P.L., Bossard M.J., Graninger M., Gritsch H., Hollriegel W., Kaliwoda M., Matthiessen P., Mitterer A., Muchitsch E.M., Purtscher M., et al. // *Hamostaseologie.* 2012. V. 32. Suppl 1. P. S29–38.
175. Dumont J.A., Liu T., Low S.C., Zhang X., Kamphaus G., Sakorafas P., Fraley C., Drager D., Reidy T., McCue J., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 13. P. 3024–3030.
176. Powell J.S., Josephson N.C., Quon D., Ragni M.V., Cheng G., Li E., Jiang H., Li L., Dumont J.A., Goyal J., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 13. P. 3031–3037.
177. Pipe S.W. // *Blood.* 2010. V. 116. № 2. P. 153–154.
178. Pipe S.W., Kaufman R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 22. P. 11851–11856.
179. Greene T.K., Wang C., Hirsch J.D., Zhai L., Gewirtz J., Thornton M.A., Miao H. Z., Pipe S.W., Kaufman R.J., Camire R.M., et al. // *Blood.* 2010. V. 116. № 26. P. 6114–6122.
180. Gale A.J., Pellequer J.L. // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. № 9. P. 1966–1971.
181. Radtke K.P., Griffin J.H., Riceberg J., Gale A.J. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 1. P. 102–108.
182. Wakabayashi H., Varfaj F., Deangelis J., Fay P.J. // *Blood.* 2008. V. 112. № 7. P. 2761–2769.
183. Parker E.T., Healey J.F., Barrow R.T., Craddock H.N., Lollar P. // *Blood.* 2004. V. 104. № 3. P. 704–710.
184. Barrow R.T., Healey J.F., Gailani D., Scandella D., Lollar P. // *Blood.* 2000. V. 95. № 2. P. 564–568.
185. Toschi V. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010. V. 12. № 5. P. 617–625.
186. Kempton C.L., Abshire T.C., Deveras R.A., Hoots W.K., Gill J.C., Kessler C.M., Key N.S., Konkle B.A., Kuriakose P., Macfarlane D.E., et al. // *Haemophilia.* 2012. V. 18. № 5. P. 798–804.
187. Milanov P., Ivanciu L., Abriss D., Quade-Lyssy P., Miesbach W., Alesci S., Tonn T., Grez M., Seifried E., Schuttrumpf J. // *Blood.* 2012. V. 119. № 2. P. 602–611.
188. Kitazawa T., Igawa T., Sampei Z., Muto A., Kojima T., Soeda T., Yoshihashi K., Okuyama-Nishida Y., Saito H., Tsunoda H., et al. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 10. P. 1570–1574.