

УДК 577.2

# Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В

Н. А. Орлова<sup>1,2</sup>, С. В. Ковнир<sup>1,2</sup>, И. И. Воробьев<sup>1\*</sup>, А. Г. Габиров<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>2</sup>Гематологический научный центр Минздравсоцразвития Российской Федерации, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

\*E-mail : ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Фактор свертывания крови IX является проферментом протеазы, играющей центральную роль в каскаде свертывания крови. Врожденное отсутствие функционального фактора IX или его низкий уровень приводят к развитию гемофилии В, заболеванию, требующему проведения постоянной заместительной терапии препаратами фактора IX. В обзоре рассмотрены текущие достижения в области получения рекомбинантного фактора IX и его модифицированных вариантов, способы получения фактора IX в трансгенных организмах и возможности генотерапии гемофилии В.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** фактор свертывания крови IX, гемофилия В, гетерологичные системы экспрессии рекомбинантных белков.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** FIX – фактор IX; FIXa – активированный FIX; ME – международная единица; ЭФР – эпидермальный фактор роста. Добавление буквы «а» к номеру соответствующего фактора свертывания – активированный фактор.

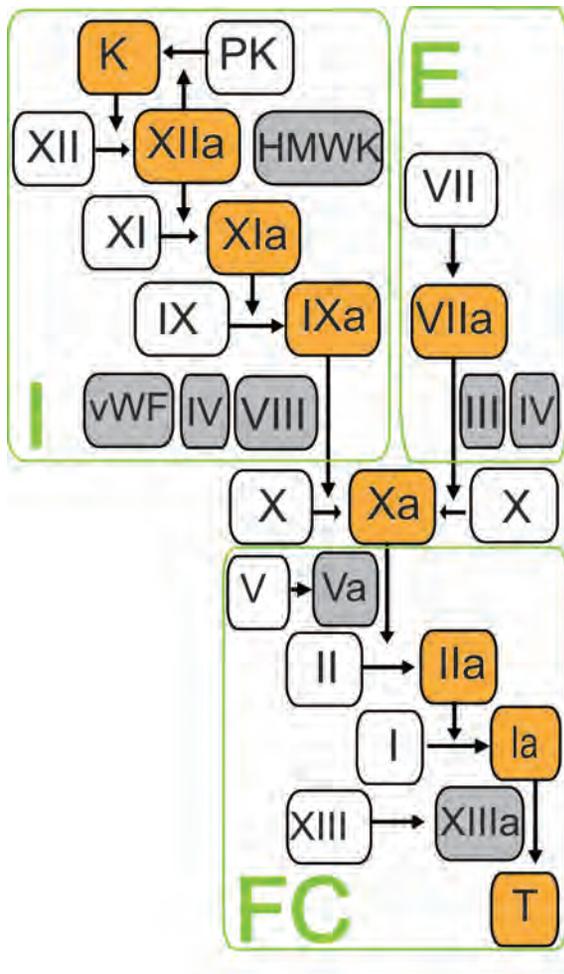
## ВВЕДЕНИЕ

Фактор IX свертывания крови (FIX, фактор Крист-маса) является проферментом сериновой протеазы, которая в присутствии  $Ca^{2+}$  и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин–изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FXa) [1]. Каталитическая эффективность FIXa сильно возрастает при связывании кофактора – активированного фактора свертывания крови VIII (FVIIIa). Нековалентный комплекс FIXa, FVIIIa и FX, связанных с фосфолипидной мембраной, называется «X-аза» или «теназа» и представляет собой основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови (рис. 1).

Фактор IX синтезируется в печени в виде неактивного белка–предшественника, который процессируется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, где подвергается множественным посттрансляционным модификациям различных типов и секретируется в кровоток после протеолитического отщепления пропептида. Циркулирующий зрелый FIX имеет молекулярную массу 57 кДа и среднюю концентрацию в плазме крови около 90 нМ. В каскаде свертывания крови FIX активируется после протеолитического расщепления активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь) с образованием двух

полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью. Активированный FIX постепенно инактивируется, в основном путем медленного связывания с антитромбином III, нексином-2, белок Z-зависимым ингибитором протеаз и рецепторами эндцитоза гепатоцитов, а также подвергается расщеплению эластазой нейтрофилов [3].

Ген фактора IX человека, расположенный на X-хромосоме, состоит из 33.5 т.п.н. и содержит восемь экзонов. Мутации единственной копии этого гена, приводящие к нарушению функции кодируемого белка, обуславливают нарушение системы свертывания крови – гемофилию В. Список мутаций гена FIX, выявленных у больных гемофилией В, приведен в специализированной базе данных [4]. Тяжелая форма гемофилии В, требующая регулярной заместительной терапии, встречается с частотой 1 случай на 30 тыс. мужчин, что составляет около 20% всех больных гемофилией. Недавно было установлено, что представители европейских королевских семей страдали именно гемофилией В, и последний предполагаемый носитель заболевания скончался в 1940 г. [5]. В данной группе семей заболевание было обусловлено точечной мутацией, которая привела к нарушению сплайсинга мРНК FIX и вызвала появление альтернативной укороченной формы белка. В некоторых случаях мутации в области промотора



#	Название	Свойства	Путь
I	Фибриноген		Е, I
II	Протромбин	ВКЗ, СП	Е, I
III	Тканевый фактор, тромбопластин	НЭК	Е
IV	Ca <sup>++</sup>	НЭК	Е, I
V	АС-глобулин, проакселерин	НЭК	Е, I
VII	Проконвертин	ВКЗ, СП	Е
VIII	Антигемофильный глобулин	НЭК	I
IX	Фактор Кристмаса	ВКЗ, СП	I
X	Фактор Стюарта-Прауэра	ВКЗ, СП	Е, I
XI	Предшественник тромбопластина	СП	I
XII	Фактор Хагеманна	СП	I
XIII	Фибринолигаза (а), фибринстабилизирующий фактор	ТГ	Е, I
vWF	Фактор Виллебранда	НЭК	I
PK	Фактор Флетчера, плазменный прекалликреин	СП	Е, I
HMWK	Фактор Фитцджеральда, высокомолекулярный кининоген плазмы	НЭК	I

Рис. 1. Схема системы свертывания крови и международная номенклатура факторов свертывания [2]. ВКЗ – витамин К-зависимый, СП – сериновая протеаза, ТГ – трансклутаминаза, НЭК – неэнзиматический кофактор; Е – внешний; I – внутренний, FC – конечный общий путь свертывания крови.

гена *FIX* приводят к менее тяжелой форме заболевания, гемофилии В «Лейден» [6], характеризующейся почти полным отсутствием *FIX* в детстве и устойчивым увеличением уровня *FIX* в период полового созревания до близких к норме значений.

Современная практика, применяемая при гемофилии В, сводится к заместительной белковой терапии, исключительно дорогостоящей для больных и системы здравоохранения. Всего лишь около 20% больных гемофилией В могут оплачивать такую терапию, и гемофилия В до сих пор смертельна для детей из слаборазвитых стран [7].

### ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ГЕМОФИЛИИ В

Первоначально терапия гемофилии В ограничивалась периодическими переливаниями плазмы крови, впоследствии замененными на более эффективные концентраты протромбинового комплекса – смеси ви-

тамин К-зависимых факторов свертывания крови IX, II, VII и X. Основным ограничением такой терапии был существенный риск развития тромботических эпизодов. Лекарственные препараты *FIX* с большей степенью чистоты были получены из фракций плазмы крови, разделяемой методом Кона, при помощи дополнительной очистки ионообменной хроматографией. Безопасность всех лекарственных препаратов *FIX*, получаемых из донорской плазмы, была существенно улучшена после внедрения процессов вирусинактивации, включающих прогревание, обработку тиоцианатом натрия или детергентом и растворителем для удаления оболочечных вирусов, а также процесса нанофильтрации для удаления безоболочечных вирусов [8].

Безопасность плазменных концентратов *FIX* также лимитируется существенным уровнем примеси активированного *FIX* (*FIXa*) и остаточных количеств

других факторов свертывания, достаточных для увеличения риска возникновения тромботических эпизодов. Дополнительная очистка FIX при помощи иммуноаффинной хроматографии позволяет полностью удалить эти примеси [9], однако, как и в случае других продуктов переработки плазмы крови, риск вирусного или прионного инфицирования больных не может быть полностью устранен [10].

### РЕКОМБИНАНТНЫЙ FIX

В 1982 г. клонировали кДНК FIX [11], а вслед за этим в 1985 г. на основе клеток гепатомы крысы, фибробластов мыши и линии клеток почки хомячка (ВНК) получили клеточные линии, секретирующие биологически активный FIX в культуральную среду [12–14]. В 1986 г. была получена линия клеток СНО (яичник китайского хомячка), продуцирующая FIX и пригодная для промышленного культивирования [15].

В настоящий момент зарегистрирован один лекарственный препарат рекомбинантного FIX – нонаког альфа (торговое название Бенефикс), одобренный для применения в США и странах ЕС в 1997 г. Нонаког альфа получают в клетках СНО, культивируемых в питательной среде, не содержащей сыворотки или других продуктов животного происхождения. Выделение и очистку рекомбинантного FIX проводят при помощи четырех хроматографических стадий, не используя иммуноаффинную хроматографию, потенциально присутствующие вирусы удаляют при помощи нанофильтрации на фильтре с порогом отсека 70 кДа [16]. В готовой лекарственной форме нонакога альфа не используется альбумин человека. Таким образом, в процессе получения лекарственного препарата исключено использование веществ животного происхождения и компонентов донорской плазмы [17]. Исходные варианты готовой лекарственной формы рекомбинантного FIX были рассчитаны на изготовление флаконов, содержащих 250–1000 МЕ лиофилизованного белка. В дальнейшем был разработан вариант фармацевтической композиции, позволяющий увеличить содержание основного вещества до 2000 МЕ на флакон [18] и хранить препарат при комнатной температуре.

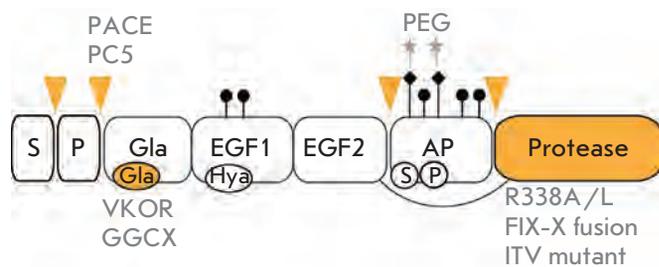
В ходе клинических испытаний рекомбинантного FIX было установлено, что безопасность и клиническая эффективность рекомбинантного и получаемого из плазмы крови вариантов FIX не имеют существенных различий. После проведения 1514 инфузий рекомбинантного FIX 56 больным не выявлено ни одного случая вирусной инфекции [19]. Уровень иммунного ответа на вводимый препарат также был сходным у рекомбинантного FIX и получаемого из плазмы крови [20].

Различия в структуре рекомбинантного и природного FIX, а также функциональная значимость таких различий подробно изучены в ряде работ. Первоначально было установлено, что структура рекомбинантного и природного FIX весьма сходна [21]. В то же время уровень восстановления активности FIX *in vivo* после инфузии рекомбинантного препарата был значительно ниже, чем при использовании природного FIX [22], что привело к увеличению рекомендуемой терапевтической дозы рекомбинантного FIX в 1.5–2 раза относительно природного [23]. Детальное сравнение паттернов посттрансляционных модификаций в партиях рекомбинантного FIX, полученных на двух различных производственных площадках, не выявило никаких структурных различий [24]. Таким образом, различия природного и рекомбинантного FIX не могут быть обусловлены особенностями производственных процессов.

### СТРУКТУРА И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ FIX

FIX принадлежит к семейству витамин К-зависимых факторов свертывания крови, он состоит из четырех структурных доменов – Gla, двух ЭФР-подобных доменов и С-концевого домена сериновой протеазы (рис. 2). N-Концевой лидерный пептид FIX отделяется при транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум, пропептид, непосредственно предшествующий домену Gla, отделяется при секреции зрелого белка. Активационный пептид, расположенный между вторым ЭФР-подобным доменом и доменом сериновой протеазы, специфически отделяется факторами XIa или VIIa при активации FIX.

Наличие домена Gla, расположенного на N-конце молекулы зрелого FIX, является общим признаком для витамин К-зависимых белков. Этот домен обеспечивает связывание FIX и FIXa с поверхностью эндотелиальных клеток, причем такое взаимодействие полностью нарушается при блокировании  $\gamma$ -карбоксилирования остатков Asp в составе домена [25]. Первый ЭФР-подобный домен FIX содержит высокоаффинный сайт связывания иона кальция, а также обуславливает взаимодействие FIX с фактором VIIIa [26] и с тканевым фактором [1]. В состав первого ЭФР-подобного домена входит редко встречающийся модифицированный остаток  $\beta$ -гидроксиаспартата (Huа), возникающий при  $\beta$ -гидроксилировании Asp64. Уровень данной посттрансляционной модификации не влияет на прокоагуляционную активность FIX [25], но замена Asp64 на остаток основной или нейтральной аминокислоты приводит к понижению активности FIX [27]. Второй ЭФР-подобный домен FIX принимает



**Рис. 2.** Структура FIX. S – сигнальный пептид, P – пропептид, Gla – домен Gla, EGF1 и EGF2 – ЭФР-подобные домены, AP – активационный пептид, Protease – домен сериновой протеазы. Сайты посттрансляционных модификаций: Gla –  $\gamma$ -карбоксилирование, Hya –  $\beta$ -гидроксилирование; S – сульфатирование, P – фосфорилирование,  $\blacklozenge$  – N-связанное и  $\bullet$  – O-связанное гликозилирование; точки протеолитического расщепления обозначены треугольниками. Серым обозначены ферменты, участвующие в посттрансляционном процессе FIX, и варианты искусственной модификации FIX.

участие в образовании комплекса FIXa–FVIIIa–FX [28, 29]. Он соединяется с доменом сериновой протеазы при помощи активационного пептида и единственной дисульфидной связи.

Активационный пептид FIX содержит большую часть сайтов посттрансляционных модификаций, влияющих на свойства FIX (табл. 1). Домен сериновой протеазы составляет около половины общей массы FIX, содержащийся в нем активный сайт скрыт активационным пептидом и экспонируется после его отделения. Домен сериновой протеазы не содержит известных посттрансляционных модификаций, после активации FIX он остается ковалентно связанным с N-концевой частью молекулы FIX при помощи одной дисульфидной связи, расположенной с обратной стороны домена (относительно области активного сайта). C-Конец FIXa также пространственно удален от активного сайта протеазы, что позволяет создавать слитные белки FIX и C-концевых белков-партнеров.

Из всех посттрансляционных модификаций только  $\gamma$ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность FIX [30]. Влияние остальных модификаций на функции FIX выражено в меньшей степени, в ряде случаев оно отсутствует или остается неизвестным.

В работах исследовательской группы Genetics Institute, Inc. показано, что наблюдающееся уменьшение уровня восстановления FIX *in vivo* при инфузиях рекомбинантного белка вызвано отсутствием

фосфорилирования остатка Ser158 и очень низким уровнем сульфатирования Tyr155 [21]. Было установлено, что инфузии препарата рекомбинантного FIX, обогащенного сульфатированной формой, приводят к увеличению уровня восстановления FIX *in vivo*. Одновременно с этим при выделении FIX человека из плазмы крови собак с гемофилией B, получивших инъекцию рекомбинантного FIX, наблюдалось увеличение доли сульфатированного варианта белка. Необходимо отметить, что сульфатированный Tyr155 и фосфорилированный остаток Ser158 в составе активационного пептида расположены в непосредственной близости друг от друга и от олигосахаридной группы, связанной с остатком Asn157, что может привести к затруднениям при разделении фосфорилированной и сульфатированной форм FIX.

Природный FIX подвергается как O-, так и N-гликозилированию. Сайты прикрепления O-гликанов расположены в первом ЭФР-подобном домене [31] и активационном пептиде.

Два O-связанных олигосахарида в ЭФР-подобном домене природного и рекомбинантного FIX присутствуют полностью, четыре потенциальных сайта O-гликозилирования в активационном пептиде FIX замещены частично в обоих случаях [32, 33]. Активационный пептид FIX также содержит два сайта N-гликозилирования – Asn157 и Asn167 [11], в природном FIX оба сайта полностью заняты олигосахаридами с высоким содержанием сиаловой кислоты [34]. Энзиматическое удаление всех остатков сиаловой кислоты в составе O- и N-связанных олигосахаридных групп не влияет на скорость активации FIX и его способность активировать фактор X [35]. В то же время пониженный уровень сиалирования N-гликанов, выявляемый в вариантах рекомбинантного FIX, может быть причиной изменений в связывании FIX с поверхностью эндотелиальных клеток, скорости вывода из кровотока или чувствительности к протеолизу.

Уровень последней известной посттрансляционной модификации FIX –  $\beta$ -гидроксилирования остатка Asp64 в первом ЭФР-подобном домене, в рекомбинантном FIX несколько выше, чем в природном [25]. Неполная модификация Asp64 в природном FIX указывает на отсутствие биологической значимости данной посттрансляционной модификации для функционирования FIX [36].

Лекарственный препарат рекомбинантного FIX не превосходит препараты природного FIX, по крайней мере, по требуемой инфузионной дозе и времени жизни в кровотоке, поэтому дальнейшее изучение рекомбинантных вариантов FIX и его производных может иметь клинические перспективы.

Таблица 1. Посттрансляционные модификации FIX и его производных

Структурный элемент	Домен	Функция	Природный FIX	Рекомбинантный FIX (нонаког альфа)	Слитный белок с Fc-фрагментом	Конъюгат с PEG
γ-Карбоксилирование (Glu → Gla), общее число и доля остатков Gla	Gla	Взаимодействие с мембраной клеток, связывание Ca <sup>2+</sup>	Всего 12 (12/12)	Всего 11.6 (60% 12/12; 35% 11/12; 5% 10/12)	Всего 11.2	Всего 11.6 (33% 11/12; 64% 12/12)
β-Гидроксилирование (Asp64 → Hyp)	EGF1	н/о	37%	46–49%	70%	Частично
N-Связанные олигосахариды	AP	н/о	3- и 4-антенные, сialiрированы Neu-5-Ac	Больше структур комплексного типа, выше уровень фукозилирования, больше полиацетилактазаминных структур	Обе группы присутствуют, ядро фукозилировано, 3- и 4-антенные комплексного типа	
Гетерогенность для Asn157	AP		Высокая	Низкая	Низкая	Сиалированы <i>in vitro</i>
Сиалирование для Asn167	AP		Полное	Снижено	Неполное	
O-Связанные олигосахариды						
Ser53	Gla	н/о	(Xu)1-2-Glc	(Xu)2-Glc	Отличаются от такового FIX из клеток CHO	Присутствует
Ser61	Gla	н/о	NeuAcGalGlcNAcFuc	NeuAcGalGlcNAcFuc		Присутствует
Thr159, Thr167, Thr172, Thr179 (?)	AP	Блокируют активный сайт протеазы	Частично	Частично	Частично	Частично
Сульфатирование Tyr155	AP	Уровень восстановления <i>in vivo</i>	>90%	5–15%	4%	н/о
Фосфорилирование Ser158	AP	Уровень восстановления <i>in vivo</i> ?	>90%	<10%	<10%	н/о
Активированный FIX	-	Нежелательная примесь	0.21 ± 0.01%	0.11 ± 0.0019%	<0.013%	0.03%

Примечания: н/о – не определено, домены FIX обозначены согласно рис. 2.

### УЛУЧШЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО FIX

Уровень продукции рекомбинантного FIX, обеспечиваемый промышленной линией-производителем [37], относительно низок и составляет около 30 мг/л культуры. Секрция FIX может быть увеличена на 30–50% при добавлении к культуральной среде тестостерона до 1 нМ [38] или увеличена вдвое при добавлении активатора протеинкиназы C – 4-форбол-12-мирилата-13-ацетата и кальциевого ионофора [39]. Уровень нежелательной примеси активированного FIX в кондиционированной среде можно значительно уменьшить при понижении концентрации ионов кальция с 1.12 до 0.5 мМ [40]. В другой работе той же исследовательской группы сообщается о 30% повышении уровня секретируемого FIX при увеличении концентрации ионов кальция в среде до 1.3 мМ, при этом существенного роста содержания активированного FIX не наблюдалось [41].

В исходных работах, описывающих экспрессию FIX в клетках CHO, обнаружено, что секретируемый FIX содержит значительную долю неактивных молекул с непроцессированным пропептидом. Полное или почти полное отщепление пропептида достигается только при коэкспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/фурин [42] или гомологичной ей конвертазы PC5 [43, 44].

Прокоагулянтная активность FIX зависит от уровня  $\gamma$ -карбоксилирования домена Gla – в полностью активном FIX первые 10 остатков Glu должны быть конвертированы в остатки Gla, при этом уровень конверсии двух последних остатков Glu не влияет на свойства FIX [45]. В молекуле природного FIX все 12 остатков Glu в домене Gla полностью  $\gamma$ -карбоксилированы, в то время как в рекомбинантном FIX, получаемом в клетках CHO, уровень модификации двух последних остатков Glu несколько снижен. Общее число остатков Gla в рекомбинантном FIX из клеток CHO достигает 11.5 на одну молекулу белка. Удельная прокоагулянтная активность такого FIX составляет не менее 200 МЕ/мг и не отличается от удельной активности природного FIX [37]. В случае экспрессии FIX в клетках линии ВНК наблюдалось снижение удельной прокоагулянтной активности продукта, синтезируемого высокопродуктивными линиями, что компенсировалось коэкспрессией витамин-К-2,3-эпоксид-редуктазы (VKOR), обеспечивающего восстановление эпокси-формы витамина К до активной формы, использующейся в качестве кофактора в реакции  $\gamma$ -карбоксилирования [46].

Стадия посттрансляционных модификаций, определяющая скорость секретируемого FIX культивируемыми клетками, к настоящему моменту не выявлена, поэ-

тому увеличение уровня секретируемого FIX в клетках CHO возможно при сверхэкспрессии или нокдауне различных ферментов и шаперонов CHO. Известно, что по крайней мере одна посттрансляционная модификация FIX – процессинг пропептида, может производиться не на поверхности клеток, а в культуральной среде после секретируемого продукта при коэкспрессии укороченного растворимого варианта PACE/фурин [37]. При изучении стадии, определяющей скорость посттрансляционных модификаций гомологичного FIX витамин К-зависимого белка С человека, получаемого в клетках линии 293, установлено, что скорость секретируемого продукта лимитирована N-гликозилированием [47]. Скорость секретируемого другого гомолога FIX – фактора VII, получаемого в клетках CHO, определялась двумя стадиями – посттрансляционным гликозилированием и  $\gamma$ -карбоксилированием [48]. Интересно отметить, что типичный промышленный уровень продукции FVII приблизительно в 5 раз выше уровня продукции FIX, при этом единственное значимое различие в их посттрансляционных модификациях состоит в наличии четырех–шести сайтов O-гликозилирования в молекуле FIX и двух – в молекуле FVII.

В настоящий момент при промышленном получении рекомбинантного FIX используют клетки линии CHO, которые могут быть заменены более продуктивными культивируемыми клетками из других тканей и организмов. Природный FIX продуцируется клетками печени, поэтому использование культивируемых производных гепатоцитов может существенно увеличить продуктивность линии. Так, уровень экспрессии FIX, продуцируемого в линии клеток HepG2 (гепатома человека), был в 1.5 раза выше, чем в клетках 293 (эпителий почки эмбриона человека), инфицированных одним и тем же ретровирусным вектором [39]. Перспективными могут быть и культивируемые клетки беспозвоночных. Например, уровень секретируемого FIX при трансфекции линии клеток дрозофилы Sf2 в 12 раз превышал известный уровень экспрессии FIX в клетках CHO [49].

### ТРАНСГЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ

В течение последних 20 лет молоко трансгенных животных рассматривается в качестве наилучшего источника терапевтических белков. Молоко трансгенных овец, несущих гибридный ген FIX с промоторной областью  $\beta$ -лактоглобулина, содержало небольшое количество биологически неактивного FIX [50]. Использование техники пересадки ядер соматических клеток, разработанной компанией PPL Therapeutics, Ltd., позволило несколько увеличить уровень FIX в молоке двух трансгенных овец – Молли и Полли [51]. Этот метод ранее использовали для получения

Таблица 2. Основные свойства трансгенных животных, способных секретировать FIX в молоко

Название	Беременность, мес.	Созревание, мес.	Объем молока, л <sup>*#</sup>	Период от введения трансгена до лактации, мес.	Оценка продуктивности, г <sup>*#</sup>	Продуктивность FIX, расчетная, г <sup>*</sup>	Уровни секреции FIX, с поправкой на долю биологически активной формы, опубликованные
Мышь	0.75	1	0.0015	3–6	0.01–0.02	0.000 045	30 мг/л [53]
Кролик	1	5–6	2–5	7–8	20	-	-
Овца	5	6–8	200–500	16–18	2500	5–12.5	25 мг/л, неактивен [50]
Коза	5	6–8	600–800	16–18	4000	0.008–0.011	0.0137 мг/л [52]
Свинья	4	6–8	200–400	15–16	1500	75–150	375 мг/л [55]
Корова	9	16	8000	30–33	4000–8000	-	-

\*В год на одну самку.

#По данным [58, 59].

клонированной овцы Долли. Сходный уровень FIX зафиксирован в молоке трансгенных коз – до 13.7 мг/л при доле биологически активной «гамма-гликозилированной» формы более 90% [52] и трансгенных мышей – 60 мг/л, 50% биологически активной формы FIX.

Наилучшие уровни FIX получены с использованием трансгенных свиней [54–56]. Несмотря на теоретически предсказанные исключительно высокие уровни секреции целевых белков в свиное молоко, в случае фактора IX удалось добиться только среднего уровня продуктивности (табл. 2). Предполагается, что скорость секреции FIX клетками молочной железы свиньи определяется  $\gamma$ -карбоксилированием. Максимальная специфическая активность продукта (т.е. полное  $\gamma$ -карбоксилирование FIX) описана у животных, продуцирующих FIX на уровне 200 мг/л [54]; у животных с уровнем секреции 2–3 г/л удельная активность FIX составляла только 10–20% от нормы [55]. Несмотря на относительно низкую долю правильно  $\gamma$ -карбоксилированного FIX, молоко высокопродуктивных трансгенных свиней было использовано при разработке промышленного процесса очистки FIX, позволяющего получать конечный продукт с высоким содержанием полностью  $\gamma$ -карбоксилированной формы и нормальным паттерном гликозилирования [56]. Предполагается, что получаемый таким образом FIX может использоваться для начала клинических испытаний. Можно отметить, что использование молока трансгенных свиней вместо кондиционированной культуральной среды из биореактора позволяет иметь исходный материал для выделения и очистки FIX с увеличенным в 10 раз содержанием целевого

белка. В то же время в молоке во много раз больше посторонних примесей – белков свиньи и липидов, оно нестерильно и может содержать существенные количества бактерий и эндотоксинов.

Уровень продукции биологически активной формы другого фармацевтически значимого белка – антитромбина III, обладающего сходным с FIX набором посттрансляционных модификаций, в молоке трансгенных коз был доведен до 1–2 г/л, что позволило получить конечный продукт с общим выходом 53% [57] и развернуть единственное коммерческое производство рекомбинантного антитромбина III для медицинского применения.

Уровень потребления FIX в США можно оценить как 2 кг/год, в России – 700 г/год, в мире – 40 кг/год. При существующих уровнях продукции FIX в молоке трансгенных свиней и предположительном 50% выходе готового продукта при выделении и очистке, стадо из 40 свиноматок может обеспечить потребности США, а стадо из 800 свиноматок – все мировые потребности в FIX.

Помимо молока трансгенных животных, перспективным источником фармацевтических белков могут быть семена и ткани трансгенных растений. В настоящий момент получение биологически активных витамин K-зависимых белков в трансгенных растениях невозможно, поскольку в растениях нет  $\gamma$ -карбоксилаз [60]. Это ограничение можно преодолеть коэкспрессией в растениях генов  $\gamma$ -карбоксилаз млекопитающих и соответствующих коферментов, однако маловероятно, чтобы такую комплексную задачу удалось решить в ближайшем будущем.

К настоящему моменту биологически неактивный FIX получен в трансгенных растениях томата [61] и семенах сои [62]. Очень низкий уровень экспрессии FIX – 15.84 мкг/кг, зафиксирован в свежих плодах трансгенных томатов; в семенах сои уровень FIX составил 800 мг/кг. Обе системы экспрессии позволяют получать зрелый и гликозилированный целевой белок.

У небольшой части больных гемофилией В (1.5–3%) проведение заместительной терапии препаратами FIX приводит к образованию высоких титров антител, нейтрализующих FIX [63]. Такие антитела снижают эффективность профилактических инфузий FIX и требуют постоянного увеличения доз FIX или использования очень больших количеств FIX для индукции иммунологической толерантности. Формирование иммунологической толерантности требует от нескольких месяцев до года и может сопровождаться развитием синдрома острой почечной недостаточности и анафилактических реакций. По крайней мере часть побочных явлений, возникающих при формировании иммунологической толерантности, обусловлена избыточной прокоагулянтной активностью вводимого FIX, поэтому использование биологически неактивных вариантов FIX могло бы увеличить безопасность проведения процедуры формирования иммунологической толерантности. Гибридный белок, состоящий из FIX и субъединицы В холерного токсина (трансмукозального переносчика), экспрессировали в хлоропластах табака на уровне 400 мг/кг листьев. Порошок из замороженных листьев табака использовали для индукции иммунологической толерантности у мышей с нокаутом гена *FIX*, получающих инъекции FIX человека [64]. У контрольных животных, получавших порошок из замороженных листьев нетрансформированного табака, инъекции FIX человека приводили к появлению ингибиторных антител (2–90 единиц Бетесда/мл), в то время как у мышей из опытной группы концентрация ингибитора FIX не отличалась от базового уровня. Успешное развитие иммунологической толерантности у опытных мышей подтверждалось данными по смертности в группах – 10% мышей в опытной группе и 75% мышей в контрольной группе погибли после восьми последовательных еженедельных инъекций FIX человека.

### ВАРИАНТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО FIX

Поскольку традиционная терапия гемофилии В основана на применении FIX из донорской плазмы, исходный вариант рекомбинантного FIX для медицинского применения должен был как можно точнее воспроизводить структуру природного белка. Предполагалось, что точная копия природного FIX че-

ловека будет обладать сравнимой клинической эффективностью и не будет вызывать иммунный ответ у больных. В то же время существующая заместительная терапия гемофилии В требует очень частых внутривенных введений и больших количеств дорогих препаратов FIX. Модификации молекулы FIX, позволяющие увеличить удельную прокоагулянтную активность или стабильность FIX в кровотоке, могут быть полезны для пациентов и снизить нагрузку на медицинский персонал.

Удельную прокоагулянтную активность FIX можно увеличить в 3 раза при помощи точечной замены остатка аргинина на остаток аланина (Arg338Ala) [65]. Стабильность теназного комплекса при этом остается неизменной. Замена двух аминокислотных остатков и двух коротких петель в домене сериновой протеазы FIX на гомологичные участки фактора X позволяет получить химерный белок, обладающий очень высокой протеолитической активностью и типичной для фактора X субстратной специфичностью [66]. Аналогичные свойства наблюдаются у FIX, содержащего только три замены – Tyr94Phe, Lys98Thr и Tyr177Thr [67]. Удельная прокоагулянтная активность таких химерных вариантов FIX в тестах *in vitro* и *in vivo* не определена.

Модификации FIX, позволяющие его активированной форме активировать фактор X в отсутствие природного кофактора VIIIa, могут использоваться в терапии гемофилии А вместо препаратов фактора VIII. Модифицированный таким образом FIX, в отличие от фактора VIII, может применяться и при ингибиторной форме гемофилии А. Введение мышам с нокаутом гена фактора VIII генотерапевтической плазмиды, кодирующей мутеин FIX с тройной заменой – Val181Ile, Lys265Thr, Ile383Val, приводило к улучшению показателей свертываемости крови [68], что указывает на возможность восстановления функции гемостаза при гемофилии А без использования препаратов фактора VIII.

Фармакокинетические свойства FIX можно улучшить при помощи FIX, слитого в рамке с долгоживущими белками плазмы крови, или путем конъюгации FIX с гидрофильными полимерами. Слитные белки, состоящие из FIX и сывороточного альбумина человека (HSA), получили, соединив С-концевой аминокислотный остаток FIX и N-концевой остаток в молекуле зрелого HSA нерасщепляемым линкерным пептидом или линкерным пептидом, отделяемым от молекулы FIX при его активации фактором XIa [69]. Были использованы неотщепляемые линкерные пептиды  $(G)_6V$  и  $SS(GGS)_6GS$  и отщепляемые пептидные линкеры, составленные из участков 136–154 или 137–154 FIX, окружающих N-концевой сайт отщепления активационного пептида FIX.

При активации слитных белков с неотщепляемыми линкерными пептидами домен HSA оставался прикрепленным к С-концу FIXа, а при активации слитных белков с отщепляемыми линкерными пептидами происходило образование свободной молекулы FIXа, содержащей несколько дополнительных аминокислотных остатков на С-конце молекулы. Этот остаточный пептид соответствовал последним аминокислотным остаткам второго ЭФР-подобного домена FIX (рис. 3А). Специфическая прокоагулянтная активность слитного белка с отщепляемым линкером была в 10–30 раз выше, чем у белка с неотщепляемым линкером, этот вариант отличался также существенным увеличением времени полувыведения из кровотока (по сравнению с интактным FIX) и достаточной эффективностью при коррекции времени прекращения кровотечения у мышей с генотипом FIX(-/-).

Слитные белки, содержащие фрагмент Fc иммуноглобулина G, могут обратимо связываться неонатальными Fc-рецепторами (FcRn) – гетеродимерами β-2-микроглобулина и тяжелой цепи МНС класса I-подобного белка. Рецепторы FcRn защищают молекулы иммуноглобулинов G, содержащих домен Fc, от катаболического распада путем обратимого связывания на поверхности эндотелиальных клеток [70].

Слитный белок, состоящий из FIX и Fc-фрагмента, получен с использованием клеточной линии НЕК-293Н и выделен в виде ковалентного гетеродимера FIX-Fc и свободного Fc-фрагмента (рис. 3Б). Он обладал приемлемой удельной прокоагулянтной активностью (около 50 МЕ/мг) и в опытах на различных животных моделях показал существенно увеличенное время полувыведения [44]. У низших приматов время полувыведения слитного белка из плазмы составило  $47.3 \pm 9.1$  ч против 12.7 ч у интактного FIX. Аналогичное трехкратное увеличение периода полувыведения зафиксировано в ходе I/II фазы клинических испытаний [71].

Специфическое присоединение активированных молекул полиэтиленгликоля (PEG) к N-связанным олигосахаридным группам FIX (рис. 2) приведет к получению конъюгата, распадающегося при активации FIX на модифицированный активационный пептид и FIXа, идентичный природной молекуле. Такой тип конъюгата, содержащий один остаток PEG длиной 40 кДа, присоединенный к N-связанному олигосахариду FIX (код N9-GP), использовали для исследований на животных моделях [72] и в клинических испытаниях в диапазоне доз 25–100 ЕД/кг. При этом период полувыведения N9-GP из плазмы больных составил 93 ч, что в 5 раз больше периода полувыведения интактного FIX [73]. Установлено также, что уровень восстановления активности FIX *in vivo* при введении N9-GP на 94% превышал уровень вос-

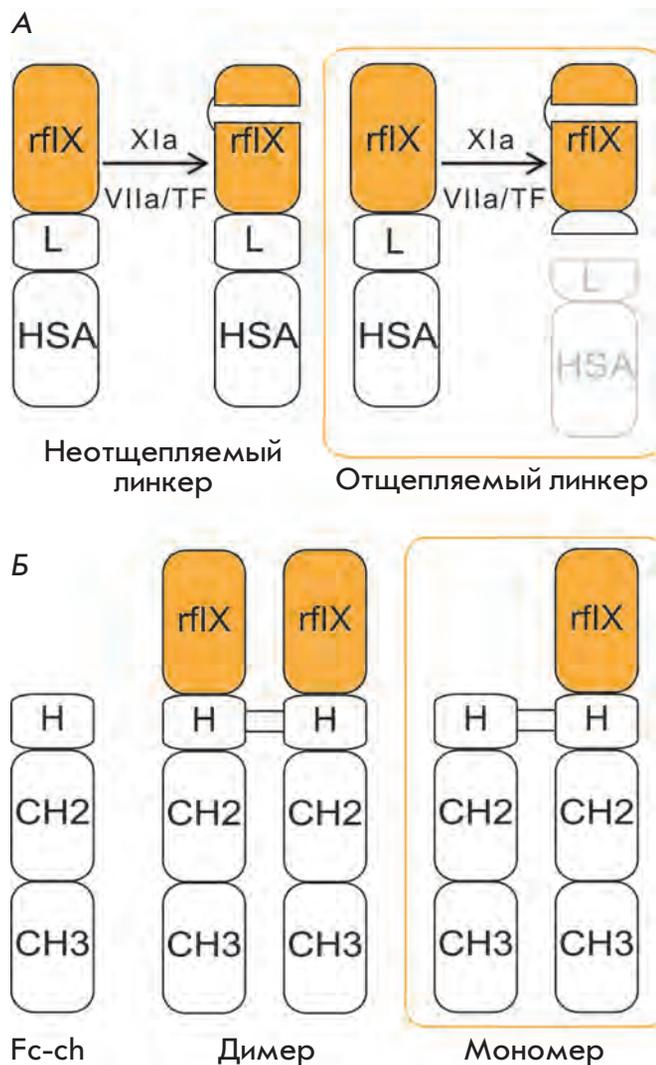


Рис. 3. Схемы слитных белков FIX. А – белок FIX–HSA, Б – белок FIX–фрагмент Fc IgG. L – линкерный пептид, Н – шарнирная область тяжелой цепи IgG, CH2 и CH3 – второй и третий константные домены тяжелой цепи IgG.

становления активности после введения интактного рекомбинантного FIX. Такое различие может быть обусловлено защитой молекулы модифицированного FIX от нежелательного взаимодействия с поверхностью эндотелиальных клеток слоем PEG или подавлением связывания N-гликанов FIX с молекулами на поверхности клеток. Другим объяснением обнаруженных различий уровня восстановления активности FIX может быть наличие полностью сialiрированных N-гликанов в составе конъюгата N9-GP.

Пролонгация действия FIX может достигаться различными методами инкапсуляции, обеспечивающими

постепенное высвобождение белка в кровотоки. С этой целью могут использоваться биоразлагаемые полимеры, липосомы и т.д., однако подробное описание этой области исследований выходит за рамки данного обзора. Весьма необычный метод инкапсуляции FIX применили недавно в ходе клинических исследований [74]. Эритроциты были смешаны с раствором FIX *ex vivo*, подвергнуты осмотическому шоку, приводящему к перемещению части FIX внутрь клеток, и введены обратно в кровоток больного. В результате наблюдали медленное высвобождение FIX из лизирующихся реинъецированных остатков эритроцитов.

### ГЕНОТЕРАПИЯ ГЕМОФИЛИИ В

Параллельно с развитием технологий получения рекомбинантного белка в терапии гемофилии В разрабатывались и стратегии генной терапии. Заместительная терапия при помощи белковых препаратов FIX имеет очевидные ограничения: она не приводит к излечению болезни, в течение всей жизни у больных сохраняется риск кровотечений и хронического повреждения суставов. Среди других существенных недостатков заместительной терапии – высокая стоимость препаратов, их нехватка, короткое время полужизни фактора IX и риск возникновения нейтрализующих антител (ингибиторов) к вводимому белку FIX.

Обе формы гемофилии (А и В) являются особенно хорошими мишенями для генной терапии, поскольку они вызываются известными единичными дефектами генов. Кроме того, они имеют широкое «терапевтическое окно» – достижение 1% от нормального уровня FIX в плазме может предотвратить большинство рисков геморрагий, а увеличение концентрации фактора свертывания до 150% также не приводит к побочным эффектам.

В случае генной терапии терапевтический уровень FIX обычно определяется как 5–10% от нормального уровня FIX в плазме. Такой уровень позволит избежать инъекций белка FIX. Экспрессия FIX на уровне ниже терапевтического в ряде случаев достаточна для индукции иммунной толерантности у больных с ингибиторной формой заболевания.

На модельных животных была показана возможность невирусной доставки гена *FIX in vivo* при помощи «голой» плазмидной ДНК. Одной гидродинамической инъекции экспрессионной плазмиды, содержащей кДНК *FIX* и гепатоцит-специфичную регуляторную область ДНК, было достаточно для поддержания терапевтического уровня FIX в FIX-дефицитных мышцах в течение 210 дней [75]. Процедура гидродинамической инъекции в данной работе сводилась к введению 50 мкг плазмиды в 2 мл

раствора в течение 5–8 с в хвостовую вену. Естественно, что такой метод введения не может применяться в клинической практике, поэтому клинические испытания, включающие доставку плазмид методом «гидродинамических инъекций», станут возможными только после существенных модификаций метода.

Доставка целевого гена в клетки организма может производиться с куда большей эффективностью при использовании вирусных векторов – либо на основе интегрирующихся в геном клетки-хозяина ретровирусов и лентивирусов, либо преимущественно эписомально персистирующих аденовирусов и аденоассоциированных вирусов.

Первые векторные системы для генетической терапии базировались на ретровирусах. Ретровирусные частицы, содержащие кДНК *FIX*, использовали для *ex vivo* трансдукции фибробластов модельных животных с последующей реимплантацией модифицированных клеток, что приводило к появлению детектируемых количеств FIX человека в плазме крови [76]. Экспрессия фактора IX наблюдалась лишь у очень небольшого процента животных с имплантированными трансдуцированными фибробластами, однако в опытах с кроликами эффект был стабильным в течение более чем 600 дней [77]. Была проведена фаза I клинических испытаний метода терапии гемофилии В, состоящего в реимплантации аутологичных фибробластов кожи, трансдуцированных *ex vivo*  $\gamma$ -ретровирусным вектором, кодирующим FIX [78], в ходе которой наблюдали транзитное умеренное увеличение уровня FIX в плазме крови двух участвовавших в исследовании пациентов.

Лентивирусные векторы, в отличие от  $\gamma$ -ретровирусных, способны трансдуцировать гепатоциты взрослого организма *in vivo*. Внутривенное введение лентивирусного вектора половозрелым мышам с нокаутом гена *FIX* обеспечивало достижение терапевтических уровней FIX в плазме (транзистентно) [79]. Известно, что лентивирусные векторы способны эффективно трансдуцировать антигенпредставляющие клетки в селезенке, что может приводить к развитию иммунной реакции против трансгенного целевого белка, попадающего в системную циркуляцию [80]. Это нежелательное свойство лентивирусных векторов может быть подавлено при ограничении экспрессии трансгена в различных типах клеток, что достигается использованием тканеспецифических промоторов или коэкспрессией микроРНК, тканеспецифично подавляющих экспрессию трансгена. Индукция стабильной экспрессии FIX в гепатоцитах мышей путем использования гепатоцит-специфичной промоторной области и микроРНК гемопоэтических клеток miR-142-3p привела к длительному (280 дней) повышению

уровня FIX (до 10% от нормального) у мышей с моделью гемофилии В [81]. Все опытные животные выжили после отсечения хвоста, ни у одного из животных не наблюдалось появления антител к FIX.

Экспрессию FIX можно ограничить гемопоэтическими клетками, чтобы обеспечить лучшее поступление целевого белка к местам его действия. Lentiviral конструкции с промотором интегрин альфа-IIb, избирательно экспрессируемые в мегакариоцитах, показали обнадеживающие результаты на мышинной модели гемофилии В – FIX накапливался в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов и высвобождался после их активации [82], фенотипическая коррекция гемофилии В подтверждена 100% выживаемостью мышей после отсечения хвоста.

Использование векторов на основе интегрирующихся вирусов, в том числе ретро- и лентивирусов, ограничивается риском инсерционного мутагенеза и активации онкогенов при интеграции вектора [80], поэтому эписомально реплицирующиеся векторы, кодирующие FIX, потенциально более безопасны и привлекают большее внимание исследователей. Аденовирусные векторы высокой емкости (HCAV), способные к долговременной эписомальной репликации и не кодирующие белки вируса, обычно вызывают сильно уменьшенный иммунный ответ. Применение тканеспецифических промоторов для ограничения типов клеток, экспрессирующих целевой ген, может еще больше уменьшить иммунный ответ, что потенциально позволяет продлить период активной экспрессии трансдуцированного целевого гена [83]. HCAV со специфичным для клеток печени промотором позволил получить терапевтически значимый уровень экспрессии FIX на моделях гемофилии В у мышей [84] и собак [85, 86] при небольшом уровне острой токсичности вектора, однако во всех случаях уровень экспрессии трансгена со временем постепенно снижался. При введении высоких доз вектора у животных наблюдалось возникновение ингибиторных антител к FIX, гематологическая и печеночная токсичность [86], что ограничивало период экспрессии трансгена у собак 446–604 днями.

Непатогенные, неспособные к самостоятельной репликации и интегрирующиеся в геном с низкой вероятностью векторы на основе аденоассоциированных вирусов считаются перспективными для доставки генов длиной не более 4.7 т.п.н. [87]. Разработан процесс производства генотерапевтических частиц аденоассоциированных вирусов, соответствующий правилам надлежащей производственной практики (GMP) [88]. Как правило, такие векторы вводят при помощи внутримышечной инъекции или инфузии в портальную вену. Такие способы введения обеспечивают преимуще-

ственную трансдукцию клеток скелетной мускулатуры или гепатоцитов.

При внутримышечной инъекции аденоассоциированных вирусных частиц AAV2-FIX собакам с гемофилией В, вызванной миссенс-мутацией, достигалась долговременная экспрессия FIX [89]. Показано, что появление ингибиторных антител зависит от природы дефекта гена *FIX* – у собак с миссенс-мутацией ингибиторные антитела не возникали [89], тогда как у собак с нонсенс-мутацией или нестабильной мРНК *FIX* отмечен значительный уровень таких антител [90], а также наблюдалась положительная корреляция между частотой развития иммунного ответа и дозой вектора [91]. Вследствие этого для клинических испытаний AAV2-FIX, вводимого путем внутримышечных инъекций, привлекали больных с миссенс-мутациями в гене *FIX* и использовали низкую дозу AAV2-FIX для каждого места инъекции [92–94]. Подобный вид терапии был безопасным для больных, однако уровни экспрессии FIX при этом не достигали терапевтически значимых величин.

Долговременная экспрессия FIX, не сопровождающаяся возникновением ингибиторных антител, получена у здоровых мышей и в мышинной модели гемофилии В, а также у собак и низших приматов при применении более инвазивной процедуры – направленного введения частиц аденоассоциированного вируса в печень [87, 95–99]. При доставке AAV2-FIX в печень собак с гемофилией В, вызванной нулевой мутацией (при которой часто появляются ингибиторные антитела к FIX), удалось добиться долговременной коррекции проявлений гемофилии (8 лет наблюдения) и не наблюдалось появления ингибиторных антител [100].

Проведены клинические испытания (фаза I) эффективности внутривенной инфузии векторов на основе AAV2, кодирующих FIX под контролем гепатоспецифичного промотора [101]. Уровень экспрессии трансдуцированного FIX достигал 10% от физиологической нормы, однако период экспрессии трансгена не превышал 6 нед., что, вероятно, объясняется развитием иммунной реакции на компоненты вирусного капсида. Предполагается, что быстрая элиминация трансдуцированных вирусов обусловлена наличием у больных иммунитета к аденоассоциированным вирусам типа 2 дикого типа, довольно распространенным в популяции [101, 102].

Другие серотипы аденоассоциированного вируса, а именно типы 8 и 9, имеющие тропизм к печени и менее распространенные в человеческой популяции [103], были проверены на модельных животных. Аденоассоциированный вирус типа 8 оказался более эффективным носителем гена *FIX*, чем вирус типа 2 у модельных мышей и собак [104, 105], и показал

длительную (до 5 лет) безопасность и эффективность у низших приматов (не человекообразных) [106]. В последнем случае терапевтически значимый уровень трансдуцированного FIX сохранялся постоянным у животных из группы с оптимальной дозой введенного вектора. Проведены клинические испытания фазы I AAV8-FIX, доставляемого к печени инфузией через периферические вены. Ожидаемые иммунные реакции больных были подавлены при помощи курсовой терапии уменьшающимися дозами преднизолона (несколько недель), у шести человек получены стабильные уровни экспрессии FIX от 1 до 8% от физиологической нормы [107]. У четырех больных заместительная терапия FIX была прекращена, у двоих – значительно сокращена.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные усилия исследователей, основой терапии гемофилии В остается заместительная терапия препаратами рекомбинантного

или полученного из донорской плазмы фактора IX. Модификация молекулы FIX при помощи добавления к FIX слитых с ним в рамке считывания доменов белков или конъюгация FIX с PEG может снизить частоту введения препаратов, но, скорее всего, не изменит стоимость и общую безопасность заместительной терапии. Генотерапия гемофилии В, проводимая при помощи вирусных векторов, несущих кДНК *FIX*, весьма перспективна для значительной части больных. Предположительно, большинство больных гемофилией В смогут сократить частоту и интенсивность заместительной терапии препаратами FIX, а некоторая часть больных – полностью отказаться от инъекций FIX. Можно ожидать, что простое увеличение производства рекомбинантного FIX, реализованное как выпуск в обращение препаратов-аналогов, получаемых при помощи все более продуктивных клеточных линий и трансгенных животных, существенно улучшит качество жизни больных гемофилией В уже в ближайшие годы. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhong D., Bajaj M.S., Schmidt A.E., Bajaj S.P. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 5. P. 3622–3631.
- Wright I.S. // *Can. Med. Assoc. J.* 1962. V. 86. P. 373–374.
- Howard E.L., Becker K.C., Rusconi C.P., Becker R.C. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. № 4. P. 722–727.
- Green P.M., Giannelli F., Sommer S.S., Poon M.-C., Ludwig M., Schwaab R., Reitsma P.H., Goossens M., Yoshioka A., Figueiredo M.S., et al. The Haemophilia B Mutation Database – version 13. 2004; <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>.
- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Faskhutdinova G., Kittler E.L., Moliaka Y.K. // *Science.* 2009. V. 326. № 5954. P. 817.
- Reitsma P.H., Bertina R.M., Ploos van Amstel J.K., Riemens A., Briet E. // *Blood.* 1988. V. 72. № 3. P. 1074–1076.
- Evatt B.L., Black C., Batorova A., Street A., Srivastava A. // *Haemophilia.* 2004. V. 10 Suppl. 4. P. 9–13.
- Tabor E. // *Transfusion.* 1999. V. 39. № 11–12. P. 1160–1168.
- Kim H.C., McMillan C.W., White G.C., Bergman G.E., Horton M.W., Saidi P. // *Blood.* 1992. V. 79. № 3. P. 568–575.
- Ludlam C.A., Powderly W.G., Bozzette S., Diamond M., Koerper M.A., Kulkarni R., Ritchie B., Siegel J., Simmonds P., Stanley S., et al. // *Lancet.* 2006. V. 367. № 9506. P. 252–261.
- Kurachi K., Davie E.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 21. P. 6461–6464.
- Anson D.S., Austen D.E., Brownlee G.G. // *Nature.* 1985. V. 315. № 6021. P. 683–685.
- de la Salle H., Altenburger W., Elkaim R., Dott K., Dieterle A., Drillien R., Cazenave J.P., Tolstoshev P., Lecocq J.P. // *Nature.* 1985. V. 316. № 6025. P. 268–270.
- Busby S., Kumar A., Joseph M., Halfpap L., Insley M., Berkner K., Kurachi K., Woodbury R. // *Nature.* 1985. V. 316. № 6025. P. 271–273.
- Kaufman R.J., Wasley L.C., Furie B.C., Furie B., Shoemaker C.B. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 21. P. 9622–9628.
- Harrison S., Adamson S., Bonam D., Brodeur S., Charlebois T., Clancy B., Costigan R., Drapeau D., Hamilton M., Hanley K., et al. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 4–10.
- Bush L., Webb C., Bartlett L., Burnett B. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 18–21.
- Lambert T., Recht M., Valentino L.A., Powell J.S., Udata C., Sullivan S.T., Roth D.A. // *Haemophilia.* 2007. V. 13. № 3. P. 233–243.
- White G., Shapiro A., Ragni M., Garzone P., Goodfellow J., Tubridy K., Courter S. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 33–38.
- Rup B. // *Dev. Biol. (Basel).* 2002. V. 109. P. 103–106.
- Bond M., Jankowski M., Patel H., Karnik S., Strang A., Xu B., Rouse J., Koza S., Letwin B., Steckert J., et al. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 11–17.
- Ewenstein B.M., Joist J.H., Shapiro A.D., Hofstra T.C., Leissing C.A., Seremetis S.V., Broder M., Mueller-Velten G., Schwartz B.A. // *Transfusion.* 2002. V. 42. № 2. P. 190–197.
- Bjorkman S. // *Haemophilia.* 2011. V. 17. № 2. P. 179–184.
- Rouse J.C., McClellan J.E., Patel H.K., Jankowski M.A., Porter T.J. // *Methods Mol. Biol.* 2005. V. 308. P. 435–460.
- Derian C.K., VanDusen W., Przysiecki C.T., Walsh P.N., Berkner K.L., Kaufman R.J., Friedman P.A. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 12. P. 6615–6618.
- Spitzer S.G., Kuppuswamy M.N., Saini R., Kasper C.K., Birktoft J.J., Bajaj S.P. // *Blood.* 1990. V. 76. № 8. P. 1530–1537.
- Rees D.J., Jones I.M., Handford P.A., Walter S.J., Esnouf M.P., Smith K.J., Brownlee G.G. // *EMBO J.* 1988. V. 7. № 7. P. 2053–2061.
- Ahmad S.S., Rawala R., Cheung W.F., Stafford D.W., Walsh P.N. // *Biochem. J.* 1995. V. 310 (Pt. 2). P. 427–431.
- Chang Y.J., Wu H.L., Hamaguchi N., Hsu Y.C., Lin S.W. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 28. P. 25393–25399.
- Larson P.J., Stanfield-Oakley S.A., VanDusen W.J., Kasper C.K., Smith K.J., Monroe D.M., High K.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 7. P. 3869–3876.
- Harris R.J., van Halbeek H., Glushka J., Basa L.J., Ling V.T., Smith K.J., Spellman M.W. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. № 26. P. 6539–6547.
- Agarwala K.L., Kawabata S., Takao T., Murata H., Shimomishi Y., Nishimura H., Iwanaga S. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 17. P. 5167–5171.

33. Kaufman R.J. // *Thromb. Haemost.* 1998. V. 79. № 6. P. 1068–1079.
34. Makino Y., Omichi K., Kuraya N., Ogawa H., Nishimura H., Iwanaga S., Hase S. // *J. Biochem.* 2000. V. 128. № 2. P. 175–180.
35. Bharadwaj D., Harris R.J., Kisiel W., Smith K.J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 12. P. 6537–6542.
36. Sunnerhagen M.S., Persson E., Dahlqvist I., Drakenberg T., Stenflo J., Mayhew M., Robin M., Handford P., Tilley J.W., Campbell I.D., et al. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 31. P. 23339–23344.
37. McGrath B.M., Walsh G. *Directory of therapeutic enzymes*. N.Y.: Taylor & Francis, 2005. 312 p.
38. Dadehbeigi N., Ostad S.N., Faramarzi M.A., Ghahremani M.H. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 11. P. 1909–1912.
39. De Castilho Fernandes A., Fontes A., Gonsales N., Swiech K., Picanco-Castro V., Faca S., Covas D. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2011. V. 58. № 4. P. 243–249.
40. Kim W.H., Kim J.S., Yoon Y., Lee G.M. // *J. Biotechnol.* 2009. V. 142. № 3–4. P. 275–278.
41. Lim I., Kim J.-S., Lee G., Choi M., Yoon Y. // *Cells and Culture / Ed. Noll T.* Amsterdam: Springer Netherlands, 2010. P. 613–618.
42. Wasley L.C., Rehemtulla A., Bristol J.A., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 12. P. 8458–8465.
43. Lusson J., Vieau D., Hamelin J., Day R., Chretien M., Seidah N.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 14. P. 6691–6695.
44. Peters R.T., Low S.C., Kamphaus G.D., Dumont J.A., Amari J.V., Lu Q., Zarbis-Papastoitis G., Reidy T.J., Merricks E.P., Nichols T.C., et al. // *Blood.* 2010. V. 115. № 10. P. 2057–2064.
45. Gillis S., Furie B.C., Furie B., Patel H., Huberty M.C., Switzer M., Foster W.B., Scoble H.A., Bond M.D. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. № 1. P. 185–196.
46. Wajih N., Hutson S.M., Owen J., Wallin R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 36. P. 31603–31607.
47. McClure D.B., Walls J.D., Grinnell B.W. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 27. P. 19710–19717.
48. Bolt G., Steenstrup T.D., Kristensen C. // *Thromb. Haemost.* 2007. V. 98. № 5. P. 988–997.
49. Vatandoost J., Zomorodipour A., Sadeghizadeh M., Aliyari R., Bos M.H., Ataei F. // *Biotechnol. Prog.* 2012. V. 28. № 1. P. 45–51.
50. Clark A.J., Ali S., Archibald A.L., Bessos H., Brown P., Harris S., McClenaghan M., Prowse C., Simons J.P., Whitelaw C.B., et al. // *Genome.* 1989. V. 31. № 2. P. 950–955.
51. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H. // *Science.* 1997. V. 278. № 5346. P. 2130–2133.
52. Zhang K., Wang H., Bao Y., Lu D., Xue J., Qiu X., Huang S., Huang Y., Li B., Li H., et al. // *Chinese Sci. Bull.* 1997. V. 42. № 15. P. 1308–1313.
53. Yull F., Harold G., Wallace R., Cowper A., Percy J., Cottingham I., Clark A.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 24. P. 10899–10903.
54. van Cott K.E., Butler S.P., Russell C.G., Subramanian A., Lubon H., Gwazdauskas F.C., Knight J., Drohan W.N., Velandier W.H. // *Genet. Anal.* 1999. V. 15. № 3–5. P. 155–160.
55. Lindsay M., Gil G.C., Cadiz A., Velandier W.H., Zhang C., van Cott K.E. // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1026. № 1–2. P. 149–157.
56. Gil G.C., Velandier W.H., van Cott K.E. // *Glycobiology.* 2008. V. 18. № 7. P. 526–539.
57. Edmunds T., van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., et al. // *Blood.* 1998. V. 91. № 12. P. 4561–4571.
58. Dove A. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 10. P. 1045–1048.
59. Panno J. *Animal Cloning: The Science of Nuclear Transfer*. N.Y.: Facts on File, 2004. 176 p.
60. Gomord V., Faye L. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. V. 7. № 2. P. 171–181.
61. Zhang H., Zhao L., Chen Y., Cui L., Ren W., Tang K. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2007. V. 48. Pt 2. P. 101–107.
62. Cunha N.B., Murad A.M., Ramos G.L., Maranhao A.Q., Brigido M.M., Araujo A.C., Lacorte C., Aragao F.J., Covas D.T., Fontes A.M., et al. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. № 4. P. 841–855.
63. DiMichele D. // *Br. J. Haematol.* 2007. V. 138. № 3. P. 305–315.
64. Verma D., Moghimi B., LoDuca P.A., Singh H.D., Hoffman B.E., Herzog R.W., Daniell H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 15. P. 7101–7106.
65. Chang J., Jin J., Lollar P., Bode W., Brandstetter H., Hamaguchi N., Straight D.L., Stafford D.W. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 20. P. 12089–12094.
66. Hopfner K.P., Brandstetter H., Karcher A., Kopetzki E., Huber R., Engh R.A., Bode W. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 22. P. 6626–6635.
67. Sichler K., Kopetzki E., Huber R., Bode W., Hopfner K.P., Brandstetter H. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 6. P. 4121–4126.
68. Milanov P., Ivanciu L., Abriss D., Quade-Lysson P., Miesbach W., Alesci S., Tonn T., Grez M., Seifried E., Schuttrumpf J. // *Blood.* 2012. V. 119. № 2. P. 602–611.
69. Metzner H.J., Weimer T., Kronthaler U., Lang W., Schulte S. // *Thromb. Haemost.* 2009. V. 102. № 4. P. 634–644.
70. Dumont J.A., Low S.C., Peters R.T., Bitonti A.J. // *BioDrugs.* 2006. V. 20. № 3. P. 151–160.
71. Shapiro A.D., Ragni M., Valentino L.A., Key N.S., Josephson N., Powell J., Cheng G., Tubridy K.L., Peters R., Dumont J., et al. // *Haemophilia.* 2010. V. 16. № Suppl. s4. P. 1–158.
72. Ostergaard H., Bjelke J.R., Hansen L., Petersen L.C., Pedersen A.A., Elm T., Moller F., Hermit M.B., Holm P.K., Krogh T.N., et al. // *Blood.* 2011. V. 118. № 8. P. 2333–2341.
73. Negrier C., Knoke K., Tiede A., Giangrande P., Moss J. // *Blood.* 2011. V. 118. № 10. P. 2695–2701.
74. Sinauridze E.I., Vuimo T.A., Kulikova E.V., Shmyrev I.I., Ataulakhanov F.I. // *Med. Sci. Monit.* 2010. V. 16. № 10. P. P119–26.
75. Kim H.S., Kim J.C., Lee Y.K., Kim J.S., Park Y.S. // *J. Gene Med.* 2011. V. 13. № 7–8. P. 365–372.
76. Palmer T.D., Thompson A.R., Miller A.D. // *Blood.* 1989. V. 73. № 2. P. 438–445.
77. Chen L., Nelson D.M., Zheng Z., Morgan R.A. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. № 16. P. 2341–2351.
78. Qiu X., Lu D., Zhou J., Wang J., Yang J., Meng P., Hsueh J.L. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 1996. V. 109. № 11. P. 832–839.
79. Tsui L.V., Kelly M., Zayek N., Rojas V., Ho K., Ge Y., Moskalenko M., Mondesire J., Davis J., Roey M.V., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 53–57.
80. Petrus I., Chuah M., van den Driessche T. // *J. Gene Med.* 2010. V. 12. № 10. P. 797–809.
81. Brown B.D., Cantore A., Annoni A., Sergi L.S., Lombardo A., Della Valle P., D'Angelo A., Naldini L. // *Blood.* 2007. V. 110. № 13. P. 4144–4152.
82. Zhang G., Shi Q., Fahs S.A., Kuether E.L., Walsh C.E., Montgomery R.R. // *Blood.* V. 116. № 8. P. 1235–1243.
83. Pastore L., Morral N., Zhou H., Garcia R., Parks R.J., Kochanek S., Graham F.L., Lee B., Beaudet A.L. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. № 11. P. 1773–1781.
84. Ehrhardt A., Kay M.A. // *Blood.* 2002. V. 99. № 11. P. 3923–3930.
85. Ehrhardt A., Xu H., Dillow A.M., Bellinger D.A., Nichols T.C., Kay M.A. // *Blood.* 2003. V. 102. № 7. P. 2403–2411.

86. Brunetti-Pierri N., Nichols T.C., McCorquodale S., Merricks E., Palmer D.J., Beaudet A.L., Ng P. // *Hum. Gene Ther.* 2005. V. 16. № 7. P. 811–820.
87. Snyder R.O., Miao C.H., Patijn G.A., Spratt S.K., Danos O., Nagy D., Gown A.M., Winther B., Meuse L., Cohen L.K., et al. // *Nat. Genet.* 1997. V. 16. № 3. P. 270–276.
88. Allay J.A., Sleep S., Long S., Tillman D.M., Clark R., Carney G., Fagone P., McIntosh J.H., Nienhuis A.W., Davidoff A.M., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. № 5. P. 595–604.
89. Herzog R.W., Yang E.Y., Couto L.B., Hagstrom J.N., Elwell D., Fields P.A., Burton M., Bellinger D.A., Read M.S., Brinkhous K.M., et al. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 1. P. 56–63.
90. Herzog R.W., Mount J.D., Arruda V.R., High K.A., Lothrop C.D., Jr. // *Mol. Ther.* 2001. V. 4. № 3. P. 192–200.
91. Herzog R.W., Fields P.A., Arruda V.R., Brubaker J.O., Armstrong E., McClintock D., Bellinger D.A., Couto L.B., Nichols T.C., High K.A. // *Hum. Gene Ther.* 2002. V. 13. № 11. P. 1281–1291.
92. Kay M.A., Manno C.S., Ragni M.V., Larson P.J., Couto L.B., McClelland A., Glader B., Chew A.J., Tai S.J., Herzog R.W., et al. // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. № 3. P. 257–261.
93. Manno C.S., Chew A.J., Hutchison S., Larson P.J., Herzog R.W., Arruda V.R., Tai S.J., Ragni M.V., Thompson A., Ozelo M., et al. // *Blood.* 2003. V. 101. № 8. P. 2963–2972.
94. Jiang H., Pierce G.F., Ozelo M.C., de Paula E.V., Vargas J.A., Smith P., Sommer J., Luk A., Manno C.S., High K.A., et al. // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. № 3. P. 452–455.
95. Snyder R.O., Miao C., Meuse L., Tubb J., Donahue B.A., Lin H.F., Stafford D.W., Patel S., Thompson A.R., Nichols T., et al. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 1. P. 64–70.
96. Nathwani A.C., Davidoff A.M., Hanawa H., Hu Y., Hoffer F.A., Nikanorov A., Slaughter C., Ng C.Y., Zhou J., Lozier J.N., et al. // *Blood.* 2002. V. 100. № 5. P. 1662–1669.
97. Mount J.D., Herzog R.W., Tillson D.M., Goodman S.A., Robinson N., McClelland M.L., Bellinger D., Nichols T.C., Arruda V.R., Lothrop C.D., Jr., et al. // *Blood.* 2002. V. 99. № 8. P. 2670–2676.
98. Wang L., Nichols T.C., Read M.S., Bellinger D.A., Verma I.M. // *Mol. Ther.* 2000. V. 1. № 2. P. 154–158.
99. Wang L., Takabe K., Bidlingmaier S.M., Ill C.R., Verma I.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 7. P. 3906–3910.
100. Niemeyer G.P., Herzog R.W., Mount J., Arruda V.R., Tillson D.M., Hathcock J., van Ginkel F.W., High K.A., Lothrop C.D., Jr. // *Blood.* 2009. V. 113. № 4. P. 797–806.
101. Manno C.S., Pierce G.F., Arruda V.R., Glader B., Ragni M., Rasko J.J., Ozelo M.C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., et al. // *Nat. Med.* 2006. V. 12. № 3. P. 342–347.
102. Mingozzi F., Maus M.V., Hui D.J., Sabatino D.E., Murphy S.L., Rasko J.E., Ragni M.V., Manno C.S., Sommer J., Jiang H., et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 4. P. 419–422.
103. van den Driessche T., Thorrez L., Acosta-Sanchez A., Petrus I., Wang L., Ma L., Waelle D.E., Iwasaki Y., Gillijns V., Wilson J.M., et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 1. P. 16–24.
104. Cooper M., Nayak S., Hoffman B.E., Terhorst C., Cao O., Herzog R.W. // *Hum. Gene Ther.* 2009. V. 20. № 7. P. 767–776.
105. Wang L., Calcedo R., Nichols T.C., Bellinger D.A., Dillow A., Verma I.M., Wilson J.M. // *Blood.* 2005. V. 105. № 8. P. 3079–3086.
106. Nathwani A.C., Rosales C., McIntosh J., Rastegarlar G., Nathwani D., Raj D., Nawathe S., Waddington S.N., Bronson R., Jackson S., et al. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 5. P. 876–885.
107. Nathwani A.C., Tuddenham E.G., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D.C., Chowdary P., Riddell A., Pie A.J., Harrington C., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365. № 25. P. 2357–2365.