(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201991582 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2013.04.16

(51) Int. Cl. ***A61K 47/48*** (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(54) ПОДКОЖНОЕ ВВЕДЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ ФАКТОРОВ КРОВИ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

(31) **1206628.8; 1213712.1; 1214985.2**
(32) **2012.04.16; 2012.08.01; 2012.08.22**
(33) **GB**
(62) **201491702; 2013.04.16**

(71) Заявитель:
КАНТАБ БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ПЭТЕНТС ЛИМИТЕД (MT)

(72) Изобретатель:
Генри Вильям, Вольф-Гаррэвэй Ричард, Майо Джон Чарльз, Эрл Майкл Джеймс (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к применению лекарственной формы фактора свертывания крови для лечения заболевания, связанного со свертываемостью крови, или повреждения, где указанная лекарственная форма содержит фармацевтическую композицию фактора свертывания крови, представляющего собой фактор IX, конъюгированного с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ), причем молекула ПЭГ конъюгирована непосредственно или опосредованно с фактором свертывания крови через остаток серина или треонина, через остаток гидроксила на остатке сахара, через единственный остаток цистеина, через амид, N-концевую аминогруппу или карбоксильную группу, причем дозировка фактора свертывания крови составляет от 1 до 1000 МЕ/кг, причём лекарственную форму вводят подкожно.

201991582 A2

201991582 A2

ПОДКОЖНОЕ ВВЕДЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ ФАКТОРОВ КРОВИ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

Настоящее изобретение относится к подкожной доставке терапевтических агентов, а также модификациям таких агентов с обеспечением возможности их подкожной доставки.

Многие гидрофобные (липофильные) молекулы используют для лечения инфекций, заболеваний и нарушений. Липофильные молекулы, как правило, вводят непосредственно в кровоток пациента для того, чтобы обеспечить быструю доставку к месту инфекции, заболевания и т.д. Однако период полувыведения и/или биодоступность таких молекул могут быть ниже оптимальных. Недостатки внутривенного введения включают местные и общие реакции на доставку относительно больших количеств агента в организм пациента и неудобство внутривенного введения.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что модифицирование терапевтического агента и тем самым увеличение гидрофильности и размеров молекул указанного агента приводит к неспособности такого агента непосредственно поступать в сосудистую систему. Однако модифицированный агент тем не менее становится биодоступным благодаря способности проникать в кровеносную систему пациента через водную лимфатическую систему. Модификацию выбирают для того, чтобы уменьшить поверхностную адгезию терапевтического агента к соединительным тканям и чтобы увеличить его растворимость в тканевой жидкости. Модифицированные терапевтические агенты согласно настоящему изобретению особенно полезны, когда их доставляют в подкожное пространство, так как они слишком крупные для проникновения в сосудистую систему непосредственно из подкожного пространства и, следовательно, переносятся по всему организму по лимфатической системе, проникая в кровеносную систему через грудной проток (правый лимфатический проток и подключичные вены). Это неожиданно приводит к предсказуемой устойчивой инфузии агента в кровеносную систему пациента. Соответственно, настоящее изобретение относится к подкожной доставке модифицированного агента для того, чтобы сделать действие модифицированного агента более предсказуемым по продолжительности, скорости инфузии и скорости выведения, и, таким образом, длительности эффекта. Это достигается путем приведения агента в более гидрофильное состояние и модификации размеров молекул так, чтобы при подкожной доставке пациенту модифицированный агент не мог пройти через стенки кровеносных сосудов и попасть в кровоток, а переносился интерстициальной жидкостью так, чтобы проникать в лимфатическую систему. Это приводит к контролируемому предсказуемому высвобождению в сосудистую систему из лимфатической системы. Это избавляет от

необходимости учитывать уровень васкуляризации вокруг участка доставки, как обсуждается ниже.

Настоящее изобретение может быть применимо к пептидам, биомолекулам, включая все факторы крови, гормоны, антибиотики, моноклональные антитела и некоторые малые молекулы. Может быть использована любая подходящая модификация, которая не препятствует терапевтическому эффекту молекулы и которая увеличивает гидрофильность и изменяет размеры молекул (которые могут включать молекулярную массу или физический размер модифицированного агента) для того, чтобы она не могла непосредственно проникать в сосудистую сеть без прохождения сначала в подключичную вену через лимфатическую систему в грудном протоке. Выбранная модификация может оказывать сопутствующий эффект регулирования выведения агента из организма (путем выделения, расщепления, иммунологической атаки или иным путем), благодаря чему скорость инфузии и скорость выведения агента «уравновешиваются» для оказания оптимального терапевтического эффекта.

Примеры подходящих модификаций включают конъюгацию агента с полимером, соответственно с биосовместимым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полифосфатидилхолин (PC), полипропиленгликоль (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, полиэтиленоксид (ПЭО), полиоксиэтилированный полиол, полиолефиновый спирт, полигидроксиалкилметакрилат, полисахариды, поли-α-гидроксикислота, поливиниловый спирт, полифосфазен, поли-N-акрилоилморфолин, полиалкиленоксидные полимеры, полималеиновая кислота, поли-DL-аланин, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, крахмал или производные крахмала, гиалуроновая кислота, хитин, полиметакрилаты, полисиаловая кислота (PSA), полигидроксиалканоаты, полиаминокислоты и их комбинации. Биосовместимый полимер может иметь линейную или разветвленную структуру.

Другими примерами биосовместимых полимеров является белок, выбранный из, но не ограниченный ею, группы, состоящей из альбумина, трансферрина, иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, фрагменты антител, например; однодоменные антитела, V_L, V_H, Fab, $F(ab')_2$, Fab′, Fab3, scFv, ди-scFv, sdAb, Fc, и их комбинаций.

Другие способы модификации терапевтического агента могут заключаться в использовании гибридных белков; включении в носители для везикулярной доставки, такие как липосомы, трансферсомы или мицеллы; включении в/присоединении к дендримерам; образовании олигомерных комплексов агента. Выбранная модификация может оказывать сопутствующий эффект регулирования выведения агента из организма (путем выделения, расщепления, иммунологической атаки или иным путем), благодаря чему скорость инфузии и скорость выведения агента «уравновешиваются» для оказания оптимального терапевтического эффекта.

После доставки в подкожное пространство модифицированный агент, локализованный таким образом, может переноситься через лимфатическую систему с инфузией в сосудистую систему через подключичные вены, после чего такие модификации также регулируют выведение агента из организма таким образом, что отношение скорости инфузии из подкожного пространства в кровообращение к скорости выведения лекарственного средства из организма можно уравновешивать и контролировать таким образом, чтобы оптимизировать терапевтическую эффективность и эффективность модифицированного агента.

Пример терапевтических агентов, которые могут быть модифицированы для подкожной доставки данным способом, включает факторы свертывания крови. В каскад свертывания крови вовлечен ряд различных белков, которые различным образом служат для активации друг друга и способствования образованию сгустка крови и поддержания нормального гемостаза. В некоторых вариантах реализации фактор свертывания крови для модификации согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из фактора VII, фактора VIIa, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда и протеина C. В некоторых вариантах реализации фактор свертывания крови представляет собой соответственно фактор VII, фактор VIII или фактор IX.

Пример терапевтических агентов, к которым относится настоящее изобретение, включает фактор свертывания крови VII (обозначаемый в настоящем описании FVII), который представляет собой гликозилированный витамин K-зависимый одноцепочечный зимоген массой 53000 Дальтон (Да), содержащий 12 нативных дисульфидных связей (O'Hara *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84: 5158-5162 (1987)). Данный белок вырабатывается преимущественно в печени. FVII вовлечен во внешний каскад свертывания крови (фиг.1). Белок образован четырьмя дискретными доменами: N-концевой γ-карбоксиглутаматный (Gla) домен, два подобных эпидермальному фактору роста (EGF) домена и C-концевой домен сериновой протеазы. Указанный циркулирующий зимоген демонстрирует очень слабую протеазную активность в отсутствии кофактора - тканевого фактора (TF), который обнаружен в субэндотелии сосудов. После повреждения сосуда FVII связывается с TF с высокой аффинностью и превращается в активный двухцепочечный фермент - фактор VIIa (FVIIa) путем специфического расщепления пептидной связи между аргинином 152 и изолейцином 153. Легкая цепь FVIIa состоит из N-концевого Gla и подобных EGF доменов, а тяжелая цепь состоит из домена сериновой протеазы. Тяжелая и легкая цепи удерживаются вместе одинарной дисульфидной связью между цистеином 135 и цистеином 262. После активации FVIIa быстро катализирует превращение фактора X (FX) в фактор Xa (FXa) и фактора IX (FIX) в фактор IXa (FIXa). Затем FXa образует комплекс с FVa с расщеплением протромбина, что приводит к выработке маленьких количеств тромбина

(Aitken, M. G. *EMA*, 16: 446-455 (2004)). Данная выработка тромбина активирует тромбоциты и кофакторы V, VIII и XI на поверхности тромбоцитов. Данная активация приводит к выбросу тромбина, который вызывает полимеризацию фибрина и образование гемостатической пробки.

Рекомбинантный FVIIa человека был разработан и поставлен на коммерческую основу компанией Novo Nordisk в виде НовоСэвен® (эптаког альфа [активированный], код ATX: B02BD08). НовоСэвен® лицензирован для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией A или B, у которых выработались ингибирующие антитела к FVIII или IX соответственно (Jurlander *et al.*, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis,* 27: 373-383 (2001); Roberts *et al.*, *Blood*, 15: 3858-3864 (2004)). Данное лечение оказалось безопасным и эффективным с момента его «запуска» в 1996 году. Однако из-за того, что данные белки имеют относительно короткий период полувыведения *in vivo* (2,3 часа; Обобщенная справка, на основании которой получено одобрение НовоСэвен® FDA, номер 96-0597) могут быть необходимы многократные инфузии высоких доз указанного продукта (90 мкг $кг^{-1}$) в течение некоторого времени в ходе одного эпизода кровотечения для достижения гемостаза. Короткий период полувыведения продукта и высокая доза, необходимая для оказания желаемого терапевтического эффекта, исключают широкое применение НовоСэвен® для профилактического лечения страдающих гемофилией пациентов ингибиторами. Следовательно, очевидно, что существует потребность в разработке молекул FVIIa, имеющих увеличенный период полувыведения, улучшающий фармакокинетику (ФК) и фармакодинамику (ФД).

Фактор VIII (FVIII) является важнейшим фактором свертывания крови, также известным как антигемофилический фактор (AHF). У людей фактор VIII кодируется геном F8. Дефекты данного гена приводят к гемофилии A, хорошо известному рецессивному связанному с X-хромосомой нарушению свертываемости, поражающему приблизительно 1 из 5000 мужчин.

Ген F8, локализованный в X-хромосоме, кодирует полипептид из 2351 аминокислоты из 26 экзонов, который после расщепления сигнального пептида дает зрелую молекулу FVIII из 2332 аминокислот (Wang *et al. Int. J. Pharmaceutics*, 259: 1-15 (2003)). Было обнаружено, что FVIII синтезируется и высвобождается в кровоток эндотелием сосудов, клубочков и канальцев и синусоидальными клетками печени, хотя по-прежнему существует значительная неопределенность относительно того, что является главным участком высвобождения у людей. Молекула FVIII образована шестью белковыми доменами; NH_2-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. Зрелая молекула содержит ряд посттрансляционных модификаций, включая N-связанное и O-связанное гликозилирование, сульфонирование и образование дисульфидных связей. FVIII содержит в общей сложности 23 остатка цистеина, 16 из данных остатков образуют 8 дисульфидных связей в доменах A и C белка (McMullen *et al. Protein Science*, 4: 740-746

(1995)). Вследствие посттрансляционной модификации белка его молекулярная масса в кровообращении может составлять до 330 кДа в зависимости от уровня и типа гликозилирования. FVIII также протеолитически процессируется, так что циркулирующее соединение представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи (A1-A2-B) и легкой цепи (A3-C1-C2). Когда FVIII секретируется в кровообращение, он связывается с фактором фон Виллебранда (ФфВ) нековалентным образом. В связывание этих двух молекул вовлечены домены A3 и C2 легкой цепи FVIII (Lacroix-Desmazes *et al*. *Blood*, 112: 240-249 (2008)). Связывание с ФфВ увеличивает стабильность и период полувыведения FVIII из крови. Хотя связывание к ФфВ увеличивает период полувыведения FVIII из крови, его собственный период полувыведения составляет 15-19 часов.

Фактор VIII является важнейшим кофактором, участвующим во внутреннем пути свертывания крови. Его роль в каскаде свертывания заключается в выступлении в качестве «матрицы зарождения» для организации компонентов комплекса FXase в правильной пространственной ориентации на поверхности активированных тромбоцитов (Shen *et al*. *Blood*, 111: 1240-1247 (2008)). FVIII в начале активируется тромбином (фактор IIa) или FXa, а затем он отделяется от ФфВ в форме FVIIIa. Затем FVIIIa связывается с активированными тромбоцитами в месте повреждения сосуда и связывает FIXa через взаимодействие, опосредуемое A2 и A3. Связывание FIXa с FVIII в присутствии Ca^{2+} на поверхности тромбоцитов увеличивает протеолитическую активность FIXa приблизительно в 200000 раз. Затем данный комплекс активирует FX с образованием FXa. Затем фактор Xa со своим кофактором - фактором Va активирует больше тромбина. Тромбин в свою очередь расщепляет фибриноген до фибрина, который затем полимеризуется и перекрестно сшивается (с использованием фактора XIII) с образованием фибринового сгустка крови.

Больше не защищенный фактором ФфВ активированный FVIII протеолитически инактивируется в данном процессе (наиболее заметно активированным протеином C и фактором IXa) и быстро удаляется из кровотока.

Фактор IX (также известный как фактор Кристмаса) представляет собой сериновую протеазу системы свертывания, и дефицит данного белка вызывает гемофилию B. Фактор IX вырабатывается в виде неактивного предшественника - зимогена, который затем процессируется с удалением сигнального пептида с последующим дополнительным гликозилированием и последующим расщеплением фактором XIa или фактором VIIa с образованием двухцепочечной формы, связанной дисульфидным мостиком (Scipio et al *J Clin Invest.* 1978;61(6):1528–1538). После активации как фактора IXa и в присутствии Ca^{2+}, фосфолипидов мембран и кофактора - фактора VIII он гидролизует связь аргинин-изолейцин в факторе X с образованием фактора Xa. Фактор IX ингибируется антитромбином.

Гемофилия В представляет собой связанное с Х-хромосомой нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, вызванное множеством мутаций в гене фактора IX, приводящих к дефициту эффективного прокоагулянтного белка. Гемофилия В, которая также известна как болезнь Кристмаса, является следствием нефункционального или недостающего FIX, что препятствует нормальному инициированию внутреннего каскада. При данном состоянии могут возникать серьезные и потенциально опасные для жизни эпизоды кровотечения, которые можно устранить путем своевременного введения достаточного количества FIX. Гемостаз может поддерживаться до тех пор, пока количество циркулирующего зимогена находится в терапевтическом диапазоне.

Раннее гемофилию В лечили путем внутривенной доставки FIX плазмы или концентратов протромбинового комплекса, а в последнее время - высокоочищенным полученным из плазмы и рекомбинантным FIX. Появление рекомбинантного FIX человека из клеток яичника китайского хомячка (клеток CHO) привело лечение болезни Кристмаса к тому, что теперь стала возможной профилактическая терапия особенно у маленьких детей. Однако ограничивающим фактором в этом отношении является короткий период полувыведения, и возможная «чрезвычайная активность» которого ограничила профилактическую терапию приблизительно 3-дневными интервалами.

Одна из проблем, с которыми сталкиваются врачи, пытаясь лечить пациентов с нарушениями свертываемости крови и другими нарушениями, заключается в том, как добиться длительно действующей терапевтической дозы терапевтического агента, такого как композиция фактора свертывания крови, вводимая таким пациентам. Другой проблемой, особенно вокруг профилактического применения таких агентов, является поддержание предсказуемого стационарного уровня инфузии, распределения и выведения терапевтических агентов в организме, что таким образом позволяет избежать пилообразных «всплесков» или «пиков» уровней как агента, так и его эффектов.

Например, регуляция свертывания крови представляет собой процесс, который создает ряд основных проблем со здоровьем, включая как сбой образования сгустков крови, так и тромбоз, образование нежелательных сгустков крови. Агенты, которые предотвращают нежелательные сгустки, применяют во многих ситуациях и доступно множество таких агентов. К сожалению, большинство современных видов терапии имеют нежелательные побочные эффекты. Перорально вводимые антикоагулянты, такие как варфарин, действуют путем ингибирования действия витамина К в печени, тем самым предотвращая полное карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в витамин К-зависимых белках, что приводит к пониженной концентрации активных белков в кровеносной системе и сниженной способности образовывать сгустки. Терапия варфарином осложняется конкурентным характером указанного лекарственного

средства с мишенью. Колебания количества витамина K, поступающего с пищей, могут привести к чрезмерной дозе или недостаточной дозе варфарина. Колебания активности свертывания являются нежелательными результатом данной терапии.

Вводимые путем инъекции вещества, такие как гепарин, включая низкомолекулярный гепарин, также являются широко применяемыми антикоагулянтами. Снова, возможна чрезмерная доза данных соединений и они требуют тщательного контроля.

Другим явлением, ограничивающим применимость терапевтических пептидов, является относительно короткий период полувыведения in vivo, демонстрируемый некоторыми из данных пептидов. В целом, проблема короткого периода полувыведения in vivo означает, что терапевтические гликопептиды необходимо вводить часто и в больших дозах, которые в конечном счете преобразовываются в более высокий риск возникновения местных нежелательных реакций и более высокие затраты на медицинское обслуживание, чем могли потребоваться, если бы был доступен более эффективный способ поддержания терапевтически эффективных уровней гликопротеиновых лекарственных средств в течение более длительного времени.

Возможность обеспечивать доставку терапевтических агентов через лимфатическую систему обеспечивает контролируемую инфузию агента. Увеличенная гидрофильность также помогает скрыть молекулу от повреждения вызывающими распад ферментами, иммунной системой и т.д. Кроме того, повышенная подвижность в воде делает терапевтические агенты более биодоступными, что приводит к потребностям в более низких дозах. Это в свою очередь может привести к меньшему числу побочных эффектов, более эффективному лечению и меньшему времени, проводимому под наблюдением врача.

Авторы настоящего изобретения неожиданно продемонстрировали, что более согласованный «стационарный» уровень терапевтического агента может быть достигнут системно при модификации согласно настоящему изобретению и доставке в подкожное пространство. Данную повышенную согласованность «стационарного состояния» можно объяснить сочетанием скорости введения в сосудистую систему через лимфатическую систему (т.е. инфузии), уравновешенной скоростями метаболизма и/или распада под действием иммунной системы, и скорости выведения через почки или желудочно-кишечный тракт.

Следовательно, подкожная доставка модифицированного агента согласно настоящему изобретению может позволить уменьшить «пилообразные» пики и впадины, обычно наблюдаемые в случае повторной доставки путем болюсной инъекции. Однако бóльшая доза может быть введена путем подкожной доставки так, что C_{max} является такой же, как достигаемая путем внутривенной инъекции, и в этом случае бóльшая продолжительность терапевтического эффекта модифицированного агента

будет достигнута за счет более низкой скорости инфузии через лимфатическую систему в сосудистую систему. Таким образом, настоящее изобретение может приводить к менее частому введению. В качестве альтернативы, такая же частота введения может быть предусмотрена в случае более низкой дозы, когда вместо внутривенной доставки используют подкожную доставку согласно настоящему изобретению.

Другими словами, в течение конкретного периода времени (например, 4 дней) соотношение C_{max}: $C_{средняя}$ подкожно вводимой дозы модифицированного агента ниже, чем в случае, когда такую же дозу вводят внутривенно. Это явно является преимуществом, т.к. уровни модифицированного агента в кровотоке являются более согласованными.

Как очевидно специалисту в данной области техники, более низкая C_{max} может приносить пользу пациенту, как и более низкое соотношение C_{max}: $C_{средняя}$ или C_{max}: C_{min} (т.е. уплощенный график пиков и впадин по сравнению с типичными «пилообразными» характеристиками внутривенно вводимого лекарственного средства).

Фактор VIIa, например, иллюстрирует данную проблему, а модификация демонстрирует ее решение согласно настоящему изобретению. Факторы VII и VIIa имеют период полувыведения из крови, составляющий примерно 2-4 часа, у человека. То есть, в течение 2-4 часов концентрация пептида в сыворотке уменьшается в два раза. Когда фактор VIIa применяют в качестве прокоагулянта для лечения некоторых форм гемофилии, стандартный протокол состоит в инъекции VIIa каждые два часа и высоких дозах (от 45 до 90 мкг/кг массы тела). См. Hedner et al., Transfus. Med. Rev. 7: 78-83 (1993). Таким образом, применение данных белков в качестве прокоагулянтов или антикоагулянтов (в случае фактора VII) требует введения белков с частыми интервалами и в высоких дозах.

Конъюгацию биофармацевтических препаратов с биосовместимыми полимерами ранее успешно использовали для улучшения физико-химических характеристик таких терапевтических продуктов. Характеристики белков, которые улучшали посредством конъюгации, включают ФК, ФД и иммуногенность. Присоединение химического агента к белку может значительно увеличивать период полувыведения из крови (Jevsevar *et al.*, *Biotechnol. J.*, 5: 113-128 (2010)). Для соединений с молекулярной массой ниже предела клубочковой фильтрации конъюгация с агентом с большой молекулярной массой препятствует почечному клиренсу продукта. Кроме того, присоединение химических агентов к фармацевтическим продуктам может препятствовать опосредуемому рецепторами удалению молекулы из-за стерического затруднения.

Использование модифицирующих молекул, таких как биосовместимые полимеры, для приведения терапевтических агентов в более гидрофильное состояние также может способствовать снижению или предотвращению иммунного ответа на вводимый терапевтический агент. Указанная модификация обеспечивает «щит из воды»

вокруг агента, который может «прятать» какие-либо эпитопы, на которые иммунная система может реагировать в иных случаях. Присутствие молекул воды вокруг модифицированного терапевтического агента может образовывать клатратную структуру при нахождении в водном растворе.

Кроме того, использование модификации для обеспечения подкожной доставки агента делает возможным постепенное введение терапевтического агента в организм через лимфатическую систему, что позволяет избежать реакции, связанной с болюсными инъекциями или внутривенной инфузией больших доз, такой как «синдром красного человека», связанный с внутривенным введением некоторых антибиотиков.

Таким образом, можно представить много преимуществ, обеспечиваемых путем модификации таких терапевтических агентов для подкожной доставки и, следовательно, последующей инфузии в сосудистую систему через лимфатическую систему.

Соответственно, согласно первому аспекту настоящего изобретения предложено применение лекарственной формы фактора свертывания крови для лечения заболевания или повреждения, связанного со свертываемостью крови, где указанная лекарственная форма содержит фармацевтическую композицию фактора свертывания крови, выбранного из группы, состоящей из фактора VII, фактора VIIa, и фактора VIII, конъюгированного с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ), причем молекула ПЭГ конъюгирована непосредственно или опосредованно с фактором свертывания крови через остаток серина или треонина, через остаток гидроксила на остатке сахара, через единственный остаток цистеина, через амид, N-концевую аминогруппу или карбоксильную группу, причем доза фактора свертывания крови составляет от 1 до 1000 МЕ/кг, причём лекарственную форму вводят подкожно.

Также предложен способ лечения у пациента заболевания или повреждения, связанного со свёртываемостью крови, включающий подкожное введение лекарственной формы, представляющей собой лекарственную форму фармацевтической композиции фактора свертывания крови, выбранного из группы, состоящей из фактора VII, фактора VIIa, и фактора VIII, конъюгированного с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ), причем доза фактора свертывания крови составляет от 1 до 1000 МЕ/кг, и причем молекула ПЭГ конъюгирована непосредственно или опосредованно с фактором свертывания крови через остаток серина или треонина, через остаток гидроксила на остатке сахара, через единственный остаток цистеина, через амид, N-концевую аминогруппу или карбоксильную группу..

Подкожное введение модифицированного агента позволяет вводить пациенту более высокую дозу агента, чем путем внутривенной болюсной инъекции; повторно вводить дозу пациенту раньше, чем если бы модифицированный агент вводили внутривенно; достигать меньшего иммуногенного ответа, чем внутривенное введение модифицированного агента или эквивалентного ему; обеспечивает полезный

терапевтический эффект для пациента, продолжительность которого по меньшей мере на 12 часов больше, чем полезного терапевтического эффекта модифицированного агента при введении внутривенно; и указанный агент может быть доставлен в концентрации, превышающей концентрацию модифицированного агента, который может быть безопасно доставлен внутривенно.

Гидрофильность увеличивается по меньшей мере на соотношение размеров молекул модифицированного агента и размеров молекул немодифицированного агента. По гидрофильностью понимают гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), который может быть определен как сродство к воде, которое в контексте настоящего изобретения означает меньшую способность к адгезии к поверхности и большее диспергирование в воде.

Способы согласно настоящему изобретению обеспечивают модуляцию скорости доставки терапевтического агента из подкожного депо у субъекта, включая модификацию терапевтического агента с изменением гидрофильности указанного агента, при этом уровень гидрофильности пропорционален уровню биодоступности.

Неожиданно было обнаружено, что для достижения наибольшей продолжительности высвобождения из депо из подкожного пространства требуется меньшая степень модификации. Не ограничиваясь рамками какой-либо конкретной теории, с рациональной точки зрения это можно объяснить меньшей степенью модификации, «открывающей» некоторое количество терапевтического агента воздействию подкожной ткани, что обеспечивает низкую скорость диффузии через лимфу. Более высокая степень модификации, напротив, полностью защищает терапевтический агент, позволяя продукту быстро попадать в кровоток.

Также было показано, что лучшую биодоступность демонстрируют терапевтические агенты, которые были больше модифицированы, а именно соединения, содержащие две или три модификации, по сравнению с соединениями, содержащими одну модификацию. Таким образом, авторы настоящего изобретения подтвердили, что более высокие степени модификации и уровни гидратации обеспечивают более высокую степень подвижности и, следовательно, биодоступности.

Следовательно, для любого конкретного терапевтического агента высвобождение из подкожного депо теперь можно модулировать путем увеличения или уменьшения уровня модификации терапевтического агента.

В соответствии с настоящим изобретением подкожную доставку можно осуществлять путем подкожной инъекции, топического применения, посредством трансдермального пластыря, путем микродермальной абразии, доставки сухого порошка под высоким давлением или любым другим способом введения терапевтического средства в подкожное пространство.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен модифицированный агент, содержащий терапевтический агент и модификацию, при этом указанная модификация увеличивает гидрофильность и изменяет размеры молекул агента относительно нативного состояния терапевтического агента, для применения в способе в соответствии с первым и другими аспектами. Модификация агента может увеличивать гидрофильность агента по меньшей мере на 50% и размеры молекул агента по меньшей мере на 50% относительно нативного состояния терапевтического агента.

Примером биосовместимого полимера, который был использован в нескольких продаваемых биофармацевтических продуктах, является полиэтиленгликоль (обозначаемый в настоящем описании ПЭГ). Процесс ковалентного присоединения молекулы ПЭГ к другой молекуле называется пегилированием. На сегодняшний день девять пегилированных продуктов получили разрешение FDA на продажу, четыре из которых представляют собой лекарственные средства, являющиеся лидерами продаж: ПегИнтрон® (Schering-Plough), Пегасис® (Hoffman-La Roche), Невласта® (Amgen) и Мицера® (Micera®) (Hoffman-La Roche). Был использован ряд химических способов для конъюгирования белковых терапевтических средств с активированными молекулами ПЭГ. Для ковалентного связывания фрагментов ПЭГ с белками через аминогруппы в белках успешно использовали произвольное пегилирование. Участками присоединения чаще всего, но не исключительно, была ε-аминогруппа в боковых цепях остатков лизина. Такие произвольные реакции могут давать очень сложные смеси конъюгатов, отличающихся по количеству и месту присоединения фрагментов ПЭГ. Даже после очистки реакционных смесей после произвольной конъюгации могут присутствовать позиционные изомеры, демонстрирующие очень разные физико-химические и фармацевтические характеристики. Был разработан ряд методов сайт-специфического пегилирования и в настоящее время их используют для изготовления лучше определенных биофармацевтических продуктов. Подходы, используемые для выполнения сайт-специфического пегилирования, включают N-концевое пегилирование, направленное на цистеин, гликан, дисульфид и полигистидин пегилирование.

Было продемонстрировано, что использование ПЭГ для дериватизации пептидных терапевтических средств уменьшает иммуногенность пептидов. Например, в US 4179337 описаны неиммуногенные полипептиды, такие как ферменты и пептидные гормоны, сопряженные с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или полипропиленгликолем. В дополнение к уменьшенной иммуногенности, время клиренса из кровообращения увеличивается благодаря увеличенному размеру ПЭГ-конъюгата рассмотренных полипептидов.

Основным способом присоединения ПЭГ и его производных к пептидам является неспецифическое связывание через аминокислотный остаток пептида (см. US 4088538, US 4496689, US 4414147, US 4055635 и WO 87/00056). Другой способ присоединения ПЭГ к пептидам заключается в неспецифическом окислении гликозильных остатков в гликопептиде (см. WO 94/05332).

В данных неспецифических способах полиэтиленгликоль присоединяют произвольным неспецифическим образом к реакционноспособным остаткам в пептидном остове. Конечно, произвольное присоединение молекул ПЭГ имеет свои недостатки, включая отсутствие гомогенности конечного продукта и возможность снижения биологической или ферментативной активности пептида. Поэтому, для получения терапевтических пептидов лучшей является стратегия дериватизации, приводящая к образованию специфично меченого, легко характеризуемого, по существу гомогенного продукта.

Уровень техники в пегилировании терапевтических агентов, таких как рекомбинантные факторы свертывания крови, такие как FVIIa, FVIII и FIX, можно кратко охарактеризовать следующим образом. В WO 98/32466 предположено, что FVII может быть пегилирован, но не содержится никакой дополнительной информации по этому вопросу. В US 2008/0200651 предположено, что полипептиды FVII с активностью дикого типа или повышенной активностью, которые содержат молекулу ПЭГ, конъюгированную через искусственно введенный остаток цистеина, демонстрируют увеличенный период полувыведения *in vivo*. В US 2008/0221032 описано получение конъюгата FVIIa-полисиаловая кислота, которое привело к молекуле, демонстрирующей значительно увеличенный период полувыведения *in vivo*. В US 2009/0176967 высказана идея о том, что можно использовать ферменты для введения конкретных функциональных групп на С-конце полипептида FVII, с которыми могут быть соединены биосовместимые полимеры, такие как ПЭГ. В US 2009/0227504 описаны препараты FVIIa (или молекул, подобных FVIIa), в которых одна или более связанных с аспарагином и/или серином олигосахаридных цепей ковалентно модифицированы по меньшей мере одной полимерной группой, демонстрирующие увеличенный период полувыведения из сыворотки. В US 2010/0028939 описано, как можно модифицировать природные гликопротеины с использованием фермента галактозооксидазы с получением реакционноспособных альдегидных функциональных групп на концах гликановых цепей. Затем реакционноспособные альдегиды можно использовать для конъюгации полимерных соединений с белком с получением продукта, обладающего улучшенными фармакологическими характеристиками. В US 2010/0056428 предположено, что улучшенных фармакокинетических характеристик FVIIa можно достичь путем дериватизации гликопротеина оксимом полимерного соединения, такого как ПЭГ, в

гликозильной группе. Соответствующие сообщения были опубликованы в отношении FVIII и FIX, см. US 2008/0255026 и US 7683158 соответственно.

Другой подход к пегилированию белков был разработан компанией Polytherics и известен как TheraPEG™, согласно которому полимер ПЭГ присоединяют к представляющему интерес белку через восстановленную дисульфидную связь пары остатков цистеина в белке (WO 2005/007197). Данная технология была использована для получения пегилированного варианта фактора IX, не содержащего загрязнения фактором FIXa (WO 2009/130602), пегилированного фактора VII (WO 2011/135308) и пегилированного фактора VIII (WO 2011/135307).

Авторы настоящего изобретения в настоящее время обнаружили, что подкожное введение модифицированных терапевтических агентов, таких как пегилированные формы факторов свертывания крови, может приводить к увеличенным периодам полувыведения и длительной активности в плазме по сравнению с эквивалентными формами, доставляемыми путем внутривенного введения, особенно когда «доза скорректирована». Конкретное место, куда делают подкожную инъекцию, может либо увеличивать, либо уменьшать время появления, через которое модифицированный агент появляется в кровеносной системе. Так или иначе, достигается более низкое соотношение C_{max}: $C_{средняя}$; подобные фармакокинетические характеристики, как наблюдают, обычно относятся к составам с замедленным высвобождением и т.п. Недостатком введения немодифицированных терапевтических агентов подкожно является то, что они способны проникать непосредственно в сердечнососудистую систему, и, таким образом, полученная C_{max} и продолжительность в значительной степени зависит от состояния сосудов в месте подкожной инъекции. Очевидно, что сильно васкуляризированная область будет «поглощать» количество агента при введении путем подкожной инъекции в данную область быстрее, чем в случае инъекции в менее васкуляризированную область. Такие несоответствия можно преодолеть с применением модифицированных агентов согласно настоящему изобретению для подкожной доставки.

Получение модифицированного терапевтического агента согласно настоящему изобретению приводит к доставке молекулы в сердечнососудистую систему через лимфатическую систему и, следовательно, не зависит от сосудистой сети в месте инъекции, что приводит к более предсказуемой согласованной скорости доставки в кровообращение через лимфатическую систему.

При предшествующем рассмотрении в данной области техники составов терапевтических агентов, включая факторы свертывания крови, не учтены преимущества, которые могут быть получены в результате приготовления составов таких факторов для подкожного введения. В частности, нет указания или предположения о том, что такие составы при введении подкожно могли бы обеспечивать и поддерживать

нормальный гемостаз в течение длительных периодов времени или что они могли бы обеспечивать более устойчивый уровень биодоступности лекарственного средства (более низкое соотношение C_{max}: $C_{средняя}$) благодаря достигаемому эффекту устойчивой инфузии. Лимфатическая система обеспечивает водной жидкостью, в которой стенки сосудов содержат коллаген. Любая молекула, которая является слишком большой для прохождения через стенки кровеносных сосудов, должна использовать лимфодренаж для попадания в кровоток. Однако если в молекуле присутствует некоторая степень гидрофобности, она может прилипать к ткани как перед попаданием в лимфатическую систему, так и к стенкам лимфатических сосудов и, таким образом, будет неподвижной в жидкости. В отличие от этого, когда получено гидрофильное соединение, модифицированные агенты будут легче диспергироваться в водной фазе лимфы и легко отводиться в систему с попаданием в кровоток в грудном протоке.

Терапевтический агент в соответствии с любым из аспектов может представлять собой малую молекулу, макромолекулу, полимер и полипептид, при этом малая молекула включает снотворные и седативные средства, антиаритмические средства, антиоксиданты, противоастматические агенты, гормональные средства, включая противозачаточные средства, симпатомиметические средства, диуретические средства, регулирующие липиды агенты, антиандрогенные агенты, противопаразитарные средства, антикоагулянты, опухолевые средства, противоопухолевые средства, гипогликемические средства, тимолептические средства, транквилизаторы, лекарственные средства для лечения респираторных заболеваний, противосудорожные средства, миорелаксанты, антипаркинсонические агенты (антагонисты дофамина), цитокины, факторы роста, противораковые агенты, антитромботические агенты, гипотензивные средства, сердечнососудистые лекарственные средства, анальгезирующие средства, противовоспалительные средства, анксиолитические лекарственные средства (анксиолитики), подавляющие аппетит средства, средства от мигрени, мышечные контрактанты, антибактериальные средства (антибиотики, противовирусные средства, противогрибковые средства, вакцины), средства против артрита, противомалярийные средства, противорвотные средства, противоэпилептические средства, бронходилататоры, питательные вещества и добавки, добавки для роста, средства против энтерита, вакцины, антитела, диагностические агенты и контрастные агенты.

Примеры агентов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, кальцитонин, эритропоэтин (EPO), цередазу, церезим, циклоспорин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (GCSF), тромбопоэтин (TPO), ингибитор альфа-1-протеиназы, элкатонин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GMCSF), гормон роста, гормон роста человека (HGH), гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), гепарин,

низкомолекулярный гепарин (LMWH), интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, рецептор интерлейкина-1, интерлейкин-2, антагонист рецептора интерлейкина-1 интерлейкин-3, интерлейкин-4, интерлейкин-6, гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон (LHRH), фактор IX, инсулин, проинсулин, аналоги инсулина (например, моноацилированный инсулин, описанный в патенте США № 5922675), амилин, С-пептид, соматостатин, аналоги соматостатина, включая октреотид, вазопрессин, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), инсулиноподобный фактор роста (ИФР), инсулинтропин, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор роста нервов (NGF), факторы роста ткани, кератиноцитарный фактор роста (KGF), глиальный фактор роста (GGF), фактор некроза опухоли (TNF), эндотелиальные факторы роста, паратиреоидный гормон (ПТГ), глюкагонподобный пептид тимозин альфа-1, ингибитор IIb/IIIa, альфа-1-антитрипсин, соединения фосфодиэстеразы (PDE), ингибиторы VLA-4, бисфосфонаты, антитело к респираторно-синцитиальному вирусу, ген трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR), дезоксирибонуклеазу (ДНКазу), антисинегнойные пенициллины, такие как карбенициллин, тикарциллин, азлоциллин, мезлоциллин и пиперациллин; цефалоспорины, такие как цефподоксим, цефпрозил, цефтбутен, цефтизоксим, цефтриаксон, цефалотин, цефапирин, цефалексин, цефрадрин (cephradrine), цефокситин, цефамандол, цефазолин, цефалоридин, цефаклор, цефадроксил, цефалоглицин, цефуроксим, цефоранид, цефотаксим, цефатризин, цефацетрил, цефепим, цефиксим, цефоницид, цефоперазон, цефотетан, цефметазол, цефтазидим, лоракарбеф и моксалактам, монобактамы, такие как азтреонам; бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость клеточной мембраны (BPI), антитело анти-CMV, 13-цис-ретиноевую кислоту, макролиды, такие как эритромицин, олеандомицин, тролеандомицин, рокситромицин, кларитромицин, даверцин, азитромицин, флуритромицин, диритромицин, джозамицин, спирамицин, мидекамицин, лейкомицин, миокамицин, рокитамицин, андазитромицин (andazithromycin) и свинолид А (swinolide A); фторхинолоны, такие как ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, тровафлоксацин, алатрофлоксацин, моксифлоксицин, норфлоксацин, эноксацин, грепафлоксацин, гатифлоксацин, ломефлоксацин, спарфлоксацин, темафлоксацин, пефлоксацин, амифлоксацин, флероксацин, тозуфлоксацин, прулифлоксацин, ирлоксацин, пазуфлоксацин, клинафлоксацин и ситафлоксацин; аминогликозиды, такие как гентамицин, нетилмицин, парамецин, тобрамицин, амикацин, канамицин, неомицин и стрептомицин, ванкомицин, тейкопланин, рамполанин (rampolanin), мидепланин, колистин, даптомицин, грамицидин, колистиметат, полимиксины, такие как полимиксин B, капреомицин, бацитрацин, пенемы (penems); пенициллины, включая пенициллиназа-чувствительные агенты, такие как пенициллин G, пенициллин V, пенициллиназа-устойчивые агенты, такие как метициллин, оксациллин, клоксациллин,

диклоксациллин, флоксациллин, нафциллин; активные агенты против грамотрицательных микроорганизмов, такие как ампициллин, амоксициллин и гетациллин, циллин и галампициллин (galampicillin); и карбапенемы, такие как имипенем, меропенем, пентамидина изетионат, альбутерола сульфат, лидокаин, метапротеренола сульфат, беклометазона дипрепионат, триамцинолона ацетамид, будезонид, ацетонид, флутиказон, ипратропия бромид, флунизолид, кромолин-натрий, эрготамина тартрат, и при необходимости аналоги, агонисты, антагонисты, ингибиторы и фармацевтически приемлемые солевые формы вышеуказанного антибиотика, фактора крови, гормона, фактора роста, другого терапевтического пептида или белка, или моноклонального антитела или малой молекулы. Соответствующим образом, агент для модификации может быть выбран из группы, состоящей из фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда и протеина C. В некоторых вариантах реализации фактор свертывания крови представляет собой соответственно фактор VII, фактор VIII или фактор IX.

Агент согласно настоящему изобретению может быть модифицирован любым биосовместимым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полифосфатидилхолин (PC), полипропиленгликоль (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, полиэтиленоксид (ПЭО), полиоксиэтилированный полиол, полиолефиновый спирт, полигидроксиалкилметакрилат, полисахариды, поли-α-гидроксикислота, поливиниловый спирт, полифосфазен, поли-N-акрилоилморфолин, полиалкиленоксидные полимеры, полималеиновая кислота, поли-DL-аланин, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, крахмал или производные крахмала, гиалуроновая кислота, хитин, полиметакрилаты, полисиаловая кислота (PSA), полигидроксиалканоаты, полиаминокислоты и их комбинации. Биосовместимый полимер может иметь линейную или разветвленную структуру.

В другом варианте реализации биосовместимый полимер представляет собой белок, выбранный из, но не ограниченный ею, группы, состоящей из альбумина, трансферрина, иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, фрагменты антител, например; однодоменные антитела, V_L, V_H, Fab, $F(ab')_2$, Fab′, Fab3, scFv, ди-scFv, sdAb, Fc, и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации увеличенная гидрофильность/растворимость модифицированного терапевтического агента, доставляемого подкожно, позволяет получить данный агент в более высокой концентрации в среде для доставки, чем при доставке внутривенно. В случае, когда лекарственное средство вводят путем инъекции, это может позволять использовать меньший объем введения, который больше подходит для подкожного введения. Кроме того, в более высоких концентрациях, когда можно ожидать автокатализ немодифицированного агента, модификация предотвращает саморасщепление агента, которое в случае немодифицированной формы могло бы

привести к нежелательным опасным побочным продуктам. Например, немодифицированный фактор крови IX будет автокатализировать в высоких концентрациях с образованием фактора IXa, который опасен тромбообразованием.

Соответственно, согласно другому аспекту настоящего изобретения объем подкожной доставки модифицированного терапевтического агента составляет не больше 2 мл. Соответствующим образом, объем доставки может составлять 5 мкл, 10 мкл, 25 мкл, 50 мкл, 100 мкл, 250 мкл, 500 мкл, 750 мкл или 1 мл. В альтернативных вариантах реализации объем доставки агента может составлять не больше 1,5 мл, 2 мл, 2,5 мл, 3,0 мл или 3,5 мл. Важно отметить, что настоящее изобретение позволяет доставлять более высокую концентрацию активного агента в одной подкожной инъекции безопаснее, чем путем внутривенной инъекции, поскольку ее не доставляют непосредственно в кровоток пациента. Это имеет особенно важное значение при работе с факторами свертывания крови, поскольку высокая концентрация факторов свертывания крови, вводимых внутривенно, может привести к образованию нежелательных и опасных сгустков крови у пациента. Подкожная доставка делает возможной устойчивую инфузию активного агента в кровоток через лимфатическую систему, что таким образом позволяет избежать эффекта опасных уровней активного агента, доставляемого непосредственно в кровоток. Следовательно, поскольку концентрация доставки агента в кровоток регулируется лимфатической системой пациента, может быть доставлена более высокая концентрация в дозе для подкожного введения, что позволяет использовать меньшие объемы, чем традиционно используемые в случае внутривенной доставки.

В объем настоящего изобретения включены терапевтические агенты, которые могут быть модифицированы путем гидрофильной модификации с увеличением гидрофильности и изменением размеров молекул для предотвращения попадания непосредственно в сосудистую систему через стенки кровеносных сосудов, и которые могут быть введены пациенту путем подкожной доставки для проникновения в кровеносную систему через лимфатическую систему. Способы модификации таких агентов также включены в объем настоящего изобретения.

Лекарственные формы согласно настоящему изобретению могут быть предназначены для введения по меньшей мере один раз в сутки, по меньшей мере два раза в сутки, примерно один раз в неделю, примерно два раза в неделю, примерно один раз в две недели или примерно один раз в месяц. Способность модулировать скорость высвобождения модифицированного терапевтического агента из подкожного депо означает, что введение удобнее контролировать.

Для некоторых терапевтических веществ будет достаточно режима дозирования один раз в сутки, а для других веществ может быть подходящим или желаемым более частый режим дозирования, когда количество, доставляемое в каждой дозе, вводимой

подкожно, может быть уменьшено по сравнению со стандартной внутривенной дозой. Так, например, лекарственную форму согласно настоящему изобретению можно вводить один раз в сутки, два раза в сутки (или больше при необходимости).

Настоящее изобретение позволяет предотвращать быстрый рост и последующее падение (т.е. «пилообразно») концентрации агента в крови. Согласно настоящему изобретению предложена более согласованная предсказуемая концентрация агента в крови пациента в течение более длительного периода времени, чем традиционно наблюдаемая в случае немодифицированных агентов или того же модифицированного продукта при повторной внутривенной доставке.

Другим преимуществом настоящего изобретения является то, что оно позволяет вводить подкожно более высокую дозу агента, чем доза, которую можно безопасно вводить внутривенно. Это обеспечивает бóльшую продолжительность полезного терапевтического эффекта, чем можно было бы достичь обычным и безопасным образом путем введения более высоких доз или более частого введения доз путем внутривенной доставки. Например, в случае факторов крови, поскольку продукты доставляются через грудной проток в подключичную вену, указанный способ позволяет вводить большее количество продукта в один момент времени в виде однократной дозы подкожно, чем можно было бы ввести в один момент времени внутривенно в вену. Доставка высокой болюсной дозы в вену может вызывать нежелательное явление тромбообразования.

Другое преимущество настоящего изобретения позволяет вводить дозу агента повторно с интервалами для того, чтобы сделать возможным поддержание концентрации агента в крови на согласованном уровне, что обеспечивает продолжительный непрерывный и предсказуемый терапевтический эффект без необходимости ожидания повторного введения дозы пока концентрация агента в крови упадет до уровней, не соответствующих терапевтическим. Согласно традиционной практике повторное внутривенное введение доз с незамедлительной C_{max} и началом действия отсрочивается до тех пор, пока не будет установлено, что уровень терапевтического средства снизился до уровня, при котором добавление C_{max} в результате новой инъекции не достигнет потенциально тромбогенного уровня (т.е. снижение риска нежелательного явления), но который означает, что пациент достиг «нездорового» диапазона уровня агента в его или ее кровотоке. Другими словами, последующие дозы агента обычно не вводят пациенту пока «здоровые уровни» или терапевтически эффективные уровни агента еще присутствуют в кровотоке. Однако настоящее изобретение позволяет осуществлять повторное введение дозы агента, в то время как уровни агента в крови еще находятся в терапевтически эффективном диапазоне, таким образом, настоящее изобретение обеспечивает более согласованный терапевтический уровень белка в кровотоке, который идеальнее подходит для

профилактики. Благодаря согласованной доставке агента в кровоток через грудной проток можно избежать проблемы увеличения количества агента в кровотоке до нежелательно высоких уровней.

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложена лекарственная форма фармацевтической композиции модифицированного фактора свертывания крови для подкожного введения, которая при изготовлении в форме для подкожного введения субъекту позволяет получить лекарственную форму для введения не больше одного раза в месяц, достаточную для сохранения времени свертывания цельной крови у указанного субъекта не больше 20 минут. Также предложена жидкая лекарственная форма пегилированного фактора свертывания крови для подкожного введения не больше одного раза в месяц, при этом указанная лекарственная форма имеет C_{max}, составляющую по меньшей мере 10% и не более 90% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно, для применения для лечения нарушения свертываемости крови. Соответствующим образом, C_{max} составляет от 20% до 80% или от 30% до 70%, или от 40% до 60%. Соответствующим образом, фактор свертывания крови может представлять собой FVII, FVIII или FIX.

Под «не больше» понимают, что лекарственную форму можно вводить чаще указанного периода времени, но в этом нет необходимости; эффект подкожного введения такой лекарственной формы предполагает, что данные эффекты наблюдают на протяжении всего периода времени. Однако благодаря более низкой и согласованной C_{max} можно осуществлять более частое введение дозы без побочных эффектов для пациента.

Соответствующим образом, лекарственная форма фактора свертывания крови может быть достаточной для сохранения времени свертывания цельной крови у указанного субъекта меньше 15 минут или соответственно меньше 12 минут. В одном из вариантов реализации лекарственная форма фактора свертывания крови представляет собой лекарственную форму для введения по меньшей мере один раз в неделю или лекарственную форму для введения по меньшей мере один раз в месяц, по меньшей мере один раз в две недели, по меньшей мере один раз в полнедели.

Лекарственная форма согласно настоящему изобретению может содержать фактор свертывания крови, выбранный из группы, состоящей из фактора VIIa, фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора XIII, фактора V, фактора фон Виллебранда и протеина C. Соответствующим образом, фактор свертывания крови может представлять собой фактор FVII, FVIII или FIX.

Лекарственная форма согласно настоящему изобретению может быть модифицирована любым биосовместимым полимером, определенным в настоящем

описании. Соответствующим образом, указанная модификация представляет собой пегилирование.

Лекарственная форма может иметь C_{max}, составляющую по меньшей мере 10% и не более 90% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно. В конкретных вариантах реализации лекарственная форма может иметь C_{max} от 10% до 25% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно. В конкретных вариантах реализации лекарственная форма может иметь C_{max} от 40% до 60% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно. В конкретных вариантах реализации лекарственная форма может иметь C_{max} от 75% до 80% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно. В конкретных вариантах реализации лекарственная форма может иметь C_{max}, составляющую 75% или 78,8% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно. В одном из вариантов реализации C_{max} составляет от 75% до 80%, и фактор крови может представлять собой FVII. В другом варианте реализации C_{max} составляет от 10% до 25%, и фактор крови может представлять собой FVIII. В другом варианте реализации C_{max} составляет от 40% до 60%, и фактор крови может представлять собой FIX.

Согласно настоящему изобретению также предложена дозированная лекарственная форма, в которой доза составляет от 1 до 1000 МЕ/кг или от 5 до 500 МЕ/кг, или от 100 до 250 МЕ/кг, или от 25 до 50 МЕ/кг.

Лекарственная форма согласно настоящему изобретению позволяет реже вводить лекарственную форму, что тем не менее является достаточным для сохранения времени свертывания цельной крови у субъекта не больше 20 минут или не больше 15 минут, или не больше 10 минут. В одном из вариантов реализации лекарственная форма является достаточной для сохранения времени свертывания цельной крови меньше 12 минут. Лекарственная форма может представлять собой лекарственную форму для введения не больше одного раза в две недели, не больше одного раза в неделю, не больше двух раз в неделю, не больше одного раза в три дня, не больше одного раза в 2 дня, не больше одного раза в сутки или чаще, или реже.

Важно отметить, что одним из преимуществ настоящего изобретения является то, что нет необходимости вводить лекарственную форму пациенту, когда агент представляет собой фактор свертывания крови, чаще, чем с данными интервалами для продолжения сохранения времени свертывания цельной крови в здоровом диапазоне, но ее можно вводить чаще для способствования обеспечению «стационарного состояния», схожего с данным состоянием состава с контролируемым высвобождением. Специалист в данной области техники, как правило, считает «нормальным» время свертывания цельной крови от 10 до 12 минут, а любое время меньше 15 минут

считается здоровым у человека, не страдающего гемофилией. Когда время свертывания крови составляет больше 20 минут, считается, что оно находится в нездоровом диапазоне. Время от 15 до 20 минут, как полагают, указывает на то, что хотя кровотечение под контролем, это не нормально.

В другом варианте реализации лекарственную форму вводят реже, чем можно было бы предсказать по периоду полувыведения из плазмы в результате болюсной внутривенной инъекции. Например, болюсная инъекция модифицированного фактора IX может требоваться один раз в неделю, тогда как этот же агент, доставляемый подкожно согласно настоящему изобретению, может быть необходим только один раз в десять дней или меньше.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена лекарственная форма фармацевтической композиции, содержащая от 25 до 50 МЕ/кг модифицированного фактора свертывания крови, для подкожного введения с той же или меньшей частотой, чем в случае фактора свертывания крови, вводимого внутривенно.

Следовательно, составы согласно настоящему изобретению способны поддерживать нормальное значение гемостаза до семи дней, при этом нормальное значение определяется как время свертывания цельной крови (WBCT) меньше 15 минут, соответственно примерно 12 минут или меньше.

Составы согласно настоящему изобретению имеют C_{max} от по меньшей мере 10% до не более 90% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения данное значение может составлять по меньшей мере 75%, 78% или 80%, и фактор крови может представлять собой FVII. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения данное значение может составлять по меньшей мере 15%, 18% или 20%, и фактор крови может представлять собой FVIII. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения данное значение может составлять 40%, 45% или 50%, и фактор крови может представлять собой FIX.

Составы в конкретных вариантах реализации настоящего изобретения, в которых модифицированный агент представляет собой пегилированный фактор крови, когда они изготовлены в форме для подкожного введения не больше одного раза в месяц, содержат дозу от 25 до 50 МЕ/кг. В некоторых вариантах реализации доза может составлять 25, 30, 35, 40, 45 или 50 МЕ/кг. Доза может составлять от 25 МЕ/кг до 30 МЕ/кг, от 35 МЕ/кг до 40 МЕ/кг или от 40 МЕ/кг до 50 МЕ/кг.

В одном из вариантов реализации, когда лекарственная форма получена в виде дозы 150 МЕ/кг, состав может подходить для введения нуждающемуся в этом субъекту один раз в две недели. Соответствующим образом, состав может быть предназначен для введения не больше одного раза в две недели.

В соответствии с одним из вариантов реализации настоящего изобретения лекарственная форма модифицированного фактора свертывания крови, когда она получена в форме для подкожного введения, может приводить к поддержанию нормального гемостаза в течение по меньшей мере половины недели.

Лекарственные формы согласно настоящему изобретению при введении подкожно приводят к тому, что требуются меньшие количества модифицированного фактора свертывания (коагуляции) крови для достижения такого же терапевтического эффекта, что таким образом обеспечивает нуждающихся в лечении субъектов более безопасными продуктами. В одном из вариантов реализации достаточно половины скорректированной дозы модифицированного фактора свертывания крови, вводимой внутривенно, для достижения нормального гемостаза в течение по меньшей мере одной недели у субъектов, в частности, когда фактор свертывания крови представляет собой фактор VIIa или фактор VIII. Подходящим значением нормального гемостаза является время свертывания цельной крови (WBCT), равное примерно 12 минутам, как описано выше.

Составы согласно настоящему изобретению могут соответственно содержать меньше половины скорректированной дозы терапевтически эффективного количества исходного состава, изготовленного в форме для внутривенного введения, содержащего тот же модифицированный фактор свертывания крови, для достижения такого же терапевтического эффекта. Например, в одном из вариантов реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор IX.

Следовательно, согласно настоящему изобретению также предложена лекарственная форма модифицированного фактора свертывания крови для подкожного введения, при этом указанная лекарственная форма содержит 50% от скорректированной величины дозы, необходимой для внутривенного введения, для достижения эффективного действия той же продолжительности.

Состав, подходящий для подкожного введения, может быть соответственно получен в виде водного или по существу водного состава. Указанный состав может содержать такие дополнительные соли, консерванты и стабилизаторы, и/или вспомогательные вещества или адъюванты, которые необходимы. Лекарственные формы согласно настоящему изобретению могут быть получены в виде безводных порошков, готовых для немедленного приготовления в подходящей водной среде.

В целом, может быть предпочтительным получение таких лекарственных форм в виде буферного водного состава. Подходящие буферные растворы могут включать, но не ограничиваются ими, аминокислоты (например, гистидин), соли неорганических кислот и щелочных металлов или щелочноземельных металлов (например, соли натрия, соли магния, соли калия, соли лития или соли кальция – например, хлорид натрия, фосфат натрия). Могут присутствовать другие компоненты, такие как детергенты или

эмульгаторы (например, Твин 80® или любая другая форма Твина®), и стабилизаторы (например, бензамидин или производное бензамидина). Также могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как сахара (например, сахароза). Подходящими значениями pH являются физиологические значения pH, например, pH от 6,8 до 7,4. Могут быть получены жидкие лекарственные формы, готовые для использования в таких носителях для введения.

«Модифицированный фактор свертывания крови» представляет собой фактор свертывания крови (фактор коагуляции крови), который был связан с одним или более модифицирующими агентами, описанными выше. В некоторых вариантах реализации модификация представляет собой ПЭГ. Молекула ПЭГ может быть напрямую или опосредованно связана с фактором свертывания крови. Пегилированный фактор свертывания крови также может быть определен как «фактор свертывания крови, конъюгированный с молекулой ПЭГ» или «конъюгат фактор свертывания крови-ПЭГ».

Модифицированные факторы свертывания крови (факторы коагуляции крови) соответственно содержат по меньшей мере один из: фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда и протеина C. В некоторых вариантах реализации фактор свертывания крови соответственно представляет собой фактор VII, фактор VIII или фактор IX.

В настоящем описании термин «конъюгат фактора крови» относится к представляющему собой фактор свертывания крови белку, который был модифицирован и содержит модификацию, такую как фрагмент ПЭГ, другой конъюгированный фрагмент, определенный выше.

Термины «фактор VIIa (FVIIa)» и «фактор VII (FVII)» также являются взаимозаменяемыми, если в контексте не указано иное. FVIII используется в качестве сокращения для фактора VIII, и FIX используется в качестве сокращения для фактора IX и т.д. для факторов крови, описанных в настоящем документе.

Фактор свертывания (коагуляции) крови может быть получен из любого подходящего источника и может представлять собой рекомбинантный белок, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК с использованием методов молекулярной биологии или химически синтезированный, или трансгенно полученный в молоке млекопитающего, или указанный фактор может быть выделен из природных источников (например, выделен из плазмы крови). Соответствующим образом, фактор представляет собой фактор свертывания крови млекопитающего, такой как фактор свертывания крови человека. Ссылки на фактор коагуляции крови включают фактор свертывания крови.

Как указано в настоящем документе, настоящее изобретение относится к составам факторов свертывания крови, которые были модифицированы путем

конъюгации с одним или более модифицирующими агентами, такими как полимеры, представляющие собой полиэтиленгликоль («пегилирование»). Модификацию фактора свертывания крови можно осуществлять любыми удобными способами.

В настоящее время Твин® широко используют для получения препаратов крови. Твин® 80 представляет собой пегилированную жирную кислоту, содержащую эквивалент молекулярной массы ПЭГ приблизительно 0,8 килодальтон на молекулу Твин®.

Как рассмотрено выше, все факторы крови характеризуются в том числе свойством адгезии к поверхности. Это является необходимым свойством каскада свертывания, для которого необходимо, чтобы ферменты и кофакторы прилипали к другим участникам каскада, к поверхности тромбоцитов и к ткани в месте повреждения. Действительно, очень важно, чтобы сгусток крови оставался в месте повреждения и не «дрейфовал», вызывая опасный тромбоз. Данное свойство создает трудности при изготовлении лекарственных средств, так как факторы крови, такие как VIIa VIII и IX, будут чрезмерно прилипать к любым стеклянным и пластиковым поверхностям. На практике это уменьшают путем широкого использования полисорбата (например, Твина® 80).

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения FVIII содержит конъюгированный с ним линейный фрагмент полиэтиленгликоля массой 20 кДа. Конъюгация с ПЭГ уменьшает свойство адгезии данного фактора к поверхности до такой степени, что дополнительное использование Твина® не является необходимым.

При активации в процессе свертывания ПЭГ-FVIII тем не менее прилипает к поверхности тромбоцитов и является малым компонентом в общем процессе свертывания. В этом отношении, сгустки крови будут образовываться нормальным образом на тромбоцитах в месте повреждения.

Благодаря наличию монопегилированного фактора и тем самым устранению потребности в дополнительном Твине® в составе, можно достичь уменьшения количества полиэтиленгликоля. Выполняли расчет с использованием Когенэйта® ФС (FVIII Bayer) с определением общего количества ПЭГ на моль FVIII, используемого в составе, и сравнения с одним конъюгированным фрагментом 20 кДа, который не требует какого-либо дополнительного Твина® в своем составе. Таким образом, на основе «дозы-для-дозы» в одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложено 25,8-кратное уменьшение полиэтиленгликоля, которое с учетом также уменьшенной частоты введения доз может привести к приблизительно 80-кратному общему уменьшению введения ПЭГ.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что увеличивая водоудерживающую способность целевого терапевтического средства (например, путем дипегилирования продукта по сравнению с его монопегилированием), можно ускорять прохождение продукта в кровоток после подкожной инъекции. И наоборот,

уменьшая водоудерживающую способность (например, монопегилирование продуктов по сравнению с их дипегилированием), можно замедлять прохождение продукта в кровоток после подкожного введения, что дает эффект депо. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что, по-видимому, тот же продукт с меньшей водоудерживающей способностью (например, за счет монопегилирования или с помощью меньшей молекулы ПЭГ) противостоит диспергированию через подкожное пространство в течение более длительного времени, чем тот же продукт, модифицированный таким образом, чтобы обладать большей водоудерживающей способностью (например, путем мультипегилирования или присоединения более крупной молекулы ПЭГ), что таким образом обеспечивает усиленный эффект депо.

Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что создание продукта таким образом, чтобы он обладал бóльшим водоудерживающим свойством (например, путем увеличения «покрытия» ПЭГ путем ди- или мультипегилирования, увеличения размера ПЭГ или использования разветвленных молекул ПЭГ в отличие от линейных), по-видимому, сделает его более диспергируемым в воде в подкожном пространстве, что приведет к более высокой скорости проникновения в плазму через лимфатические сосуды; уменьшенная гидрофильность продуктов, созданных таким образом, что они обладают меньшим водоудерживающим свойством (например, путем монопегилирования или путем использования меньших молекул ПЭГ), по-видимому, оставит бóльшую часть гидрофобного терапевтического агента открытой, уменьшая его диспергируемость и замедляя его проникновение в плазму через водную лимфатическую систему.

Данная способность модифицировать дисперсионные характеристики молекулы для подкожного введения путем селективного регулирования баланса между гидрофильностью и гидрофобностью обеспечивает исключительный уровень управления контролируемым высвобождением продукта из подкожного пространства в плазму через лимфу, который можно регулировать в соответствии с характеристиками терапевтического агента, потребностями и физиологией пациента или комбинацией этих или других влияющих факторов.

В некоторых вариантах реализации, когда модификация представляет собой ПЭГ, указанный полиэтиленгликоль (ПЭГ) может иметь линейную или разветвленную структуру и может быть присоединен к терапевтическому агенту любым удобным путем. Когда терапевтический агент представляет собой белок, например, фактор свертывания крови или другой терапевтический белок, описанный в настоящем документе, конъюгация с ПЭГ может быть осуществлена через остаток серина или треонина в нативном белке, через гидроксильный остаток в остатке сахара, присоединенном к нативному белку, или через один или более остатков цистеина. Фрагмент ПЭГ может быть присоединен через такие остатки, которые встречаются в нативных или

рекомбинантных формах белка. Белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии, позволяют с помощью сайт-специфической инженерии встраивать желаемые аминокислотные остатки в белковую последовательность и/или контролировать профили гликозилирования специфичными ферментами - гликозилазами. Другие пути пегилирования включают пегилирование амидной или N-концевой аминогруппы, или пегилирование карбоксильной группы.

Фрагмент ПЭГ также может быть конъюгирован с фактором свертывания крови, т.е. фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C, через одну или более восстановленных дисульфидных связей цистеина. Свободный остаток цистеина является результатом восстановления дисульфидной связи цистина в белке. Например, конъюгация может быть осуществлена посредством линкерной группы, соединяющей мостиковой связью остатки серы двух остатков цистеина, которые образовали дисульфидную связь в факторе VII, факторе VIII, факторе IX, факторе X, факторе Xa, факторе XI, факторе VIIa, факторе V, факторе XIII, факторе фон Виллебранда или протеине C. Следовательно, дисульфидная связь может представлять собой нативную дисульфидную связь или введенную рекомбинантным способом дисульфидную связь.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения гидрофильный фрагмент, такой как цепь полиэтиленгликоля, присоединен через двухвалентную линкерную группу между двумя остатками цистеина, которые обычно образуют дисульфидный мостик в нативной форме фактора свертывания крови.

Молекула ПЭГ может иметь любую подходящую молекулярную массу, например, от 1 кДа до 100 кДа, от 10 до 500 кДа, соответственно от 5 до 30 кДа или от 20 до 30 кДа. Некоторые подходящие молекулярные массы включают 5, 10, 20 или 30 кДа. Соответствующим образом, молекула ПЭГ может быть массой от 5 кДа до 40 кДа.

Существует несколько различных типов полимеров-полиэтиленгликолей, которые будут образовывать конъюгаты с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C. Существуют линейные полимеры ПЭГ, которые содержат одну цепь полиэтиленгликоля, и существуют разветвленные или с боковыми ответвлениями полимеры ПЭГ. Разветвленный полиэтиленгликоль содержит 2 или более отдельных линейных цепей ПЭГ, связанных друг с другом через объединяющую группу. Например, два полимера ПЭГ могут быть связаны друг с другом остатком лизина. Одна линейная цепь ПЭГ связана с α-аминогруппой, тогда как другая цепь ПЭГ связана с ε-аминогруппой. Оставшаяся карбоксильная группа лизинового центра остается доступной для ковалентного присоединения к белку. Как линейные, так

и разветвленные полимеры-полиэтиленгликоли коммерчески доступны в диапазоне молекулярных масс.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения конъюгат фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C содержит один или более линейных полимеров-полиэтиленгликолей, связанных с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда и протеином C. В некоторых вариантах реализации фактор свертывания крови представляет собой фактор III, фактор VIII или фактор IX, в котором каждый ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 2 кДа до примерно 100 кДа. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения конъюгат фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C содержит один или более линейных полимеров-полиэтиленгликолей, связанных с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C, при этом каждый линейный ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 1 кДа до примерно 40 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый линейный ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 10 кДа до примерно 30 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый линейный ПЭГ имеет молекулярную массу, равную примерно 20 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый линейный ПЭГ имеет молекулярную массу, равную примерно 10 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый линейный ПЭГ имеет молекулярную массу меньше 10 кДа. В конкретных вариантах реализации конъюгат фактора крови содержит больше одного линейного полимера ПЭГ, связанного с фактором свертывания крови, например, два, три или до восьми линейных полимеров ПЭГ, связанных с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C. В некоторых вариантах реализации конъюгаты фактора крови содержат несколько линейных полимеров ПЭГ, при этом каждый линейный ПЭГ имеет молекулярную массу, равную примерно 5-30 кДа.

Конъюгат фактора крови согласно настоящему изобретению может содержать один или более разветвленных полимеров ПЭГ, связанных с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C, при этом каждый разветвленный ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 2 кДа до примерно 100 кДа. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения конъюгат фактора крови содержит один или более разветвленных полимеров-полиэтиленгликолей, связанных с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI,

фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C, при этом каждый разветвленный ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 1 кДа до примерно 100 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый разветвленный ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 40 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый разветвленный ПЭГ имеет молекулярную массу, равную примерно 10 кДа, 20 кДа или примерно 30 кДа. В некоторых вариантах реализации каждый разветвленный ПЭГ имеет молекулярную массу меньше примерно 10 кДа. В конкретных вариантах реализации конъюгат фактора крови содержит больше одного разветвленного полимера ПЭГ, связанного с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C, например, два, три или до восьми разветвленных полимеров ПЭГ, связанных с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C. В некоторых вариантах реализации конъюгаты фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C с ПЭГ содержат до восьми разветвленных полимеров ПЭГ, при этом каждый разветвленный ПЭГ имеет молекулярную массу, равную примерно 5-40 кДа, соответственно от 10 до 30 кДа.

Конъюгаты фактор крови-ПЭГ могут быть очищены методами хроматографии, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, ионообменную хроматографию и эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, разделение путем осаждения и разделение на основе мембран.

Соответствующим образом, фрагмент ПЭГ конъюгата фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C может быть связан с двумя остатками цистеина, которые образуют дисульфидную связь, в факторе коагуляции крови. Следовательно, линкер, содержащий ПЭГ, соединяет мостиком дисульфидную связь. Примеры таких методов конъюгации описаны в WO 2005/007197, WO 2009/047500 и WO 2010/010324.

Как рассмотрено выше, другие пути пегилирования могут включать стандартные процедуры гликопегилирования, как описано у Stennicke *et al* (*Thromb. Haemost.* 2008, 100(5), 920-8), или N-концевое амидное пегилирование, как описано в US 5644029.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения фрагмент ПЭГ может быть конъюгирован с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C в соответствии со схемой, приведенной на фиг.2 На фиг.2 группа R1

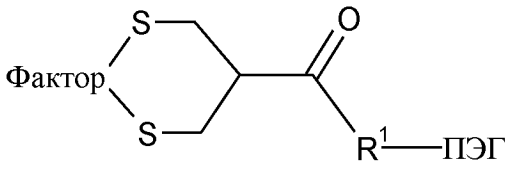
показана между фрагментом ПЭГ и линкерной группой, соединяющей атомы серы дисульфидной связи в молекуле фактора крови.

R1 представляет собой заместитель, который может представлять собой непосредственную связь, алкиленовую группу (предпочтительно C_{1-10} алкиленовую группу) или возможно содержащую заместители арильную или гетероарильную группу; при этом арильные группы включают фенильную, бензоильную и нафтильную группы; при этом подходящие гетероарильные группы включают пиридин, пиррол, фуран, пиран, имидазол, пиразол, оксазол, пиридазин, пиримидин и пурин; при этом связь с полимером может осуществляться через гидролитически лабильную связь или через нелабильную связь.

Конкретные заместители, которые могут присутствовать в возможно содержащей заместители арильной или гетероарильной группе, включают, например, один или более одинаковых или разных заместителей, выбранных из -CN, $-NO_2$, $-CO_2R$, -COH, $-CH_2OH$, -COR, -OR, -OCOR, $-OCO_2R$, -SR, -SOR, $-SO_2R$, -NHCOR, -NRCOR, $-NHCO_2R$, $-NR'CO_2R$, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N--NR'COR, $-N^+R_3$, $-N^+H_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, галогена, например, фтора или хлора, -C≡CR, $-C=CR_2$ и $^{13}C=CHR$, где каждый R или R' независимо представляет собой атом водорода или алкильную (предпочтительно C_{1-6}), или арильную (предпочтительно фенильную) группу. Присутствие электроноакцепторных заместителей особенно предпочтительно. В одном из вариантов реализации возможно содержащая заместители арильная или гетероарильная группа в R1 включает арильные или гетероарильные группы, содержащие в качестве заместителей амидную (NHCO) группу, которая соединяет группу R1 с фрагментом ПЭГ.

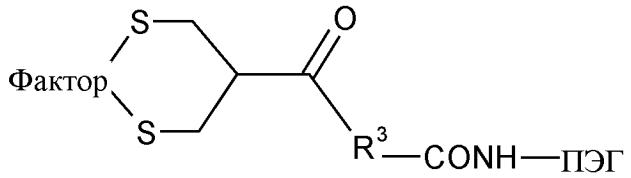
Следовательно, линкерная группа между двумя атомами серы исходной дисульфидной связи между остатками цистеина фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C может содержать 3-углеродный мостик. В одном из вариантов реализации линкерная группа между двумя атомами серы исходной дисульфидной связи между остатками цистеина фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C представляет собой $(CH_2)_2CHC(O)$-.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения фрагмент ПЭГ может быть конъюгирован, как описано выше, при этом композиция, содержащая фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Xa, фактор XI, фактор VIIa, фактор V, фактор XIII, фактор фон Виллебранда или протеин C, конъюгированный с фрагментом ПЭГ, имеет структуру:



где R1 является таким, как определено выше, и «Фактор» представляет собой фактор свертывания крови.

В вариантах реализации, в которых возможно содержащая заместители арильная или гетероарильная группа в R1, определенном выше, включает арильные или гетероарильные группы, содержащие в качестве заместителей амидную (NHCO) группу, структура конъюгированного белка, где R3 является таким, как определено ниже, может быть следующей:



R3 представляет собой заместитель, который может представлять собой непосредственную связь, алкиленовую группу (предпочтительно C_{1-10} алкиленовую группу) или возможно содержащую заместители арильную или гетероарильную группу; при этом арильные группы включают фенильную, бензоильную и нафтильную группы; при этом подходящие гетероарильные группы включают пиридин, пиррол, фуран, пиран, имидазол, пиразол, оксазол, пиридазин, пиримидин и пурин; при этом связь с полимером может осуществляться через гидролитически лабильную связь или через нелабильную связь, и «Фактор» представляет собой фактор свертывания крови.

Конкретные заместители, которые могут присутствовать в возможно содержащей заместители арильной или гетероарильной группе, включают, например, один или более одинаковых или разных заместителей, выбранных из -CN, $-NO_2$, $-CO_2R$, -COH, $-CH_2OH$, -COR, -OR, -OCOR, $-OCO_2R$, -SR, -SOR, $-SO_2R$, -NHCOR, -NRCOR, $-NHCO_2R$, $-NR'CO_2R$, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N--NR'COR, $-N^+R_3$, $-N^+H_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, галогена, например, фтора или хлора, -C≡CR, $-C=CR_2$ и $^{13}C=CHR$, где каждый R или R' независимо представляет собой атом водорода или алкильную (предпочтительно C_{1-6}), или арильную (предпочтительно фенильную) группу. Присутствие электроноакцепторных заместителей особенно предпочтительно.

В некоторых вариантах реализации лекарственные формы согласно настоящему изобретению могут состоять из пегилированных форм факторов свертывания крови, определенных в настоящем описании, в которых молекула полиэтиленгликоля представляет собой линейную (соответственно монодисперсную) форму. ПЭГ может быть конъюгирован с фактором свертывания крови через трехуглеродный мостиковый фрагмент. Например, ПЭГ может иметь массу от 1 до 100 кДа; в некоторых вариантах

реализации от 5 до 30 кДа; в некоторых вариантах реализации 10 кДа и в других вариантах реализации 20 кДа.

Лекарственная форма может быть получена для подкожного введения путем приготовления в подходящем водном носителе. В большинстве вариантов реализации подходящий водный раствор буферизуют до физиологического значения pH (например, до pH 6,8) композицией, содержащей одну или более аминокислот и/или солей (например, гистидин и NaCl) и в присутствии неионогенного поверхностно-активного вещества (например, Твина® 80) и возможно стабилизатора (например, бензамидина или производного бензамидина, см. US 7612066, например).

Неионогенные поверхностно-активные вещества/эмульгаторы, которые могут быть использованы согласно настоящему изобретению, включают полисорбаты, такие как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (полисорбат 80, Твин® 80), полисорбат 65, полисорбат 65, полисорбат 61, полисорбат 60, полисорбат 40, полисорбат 21, полисорбат 20, полисорбат 81, полисорбат 85 и полисорбат 120, и полиоксиэтиленстеараты, такие как полиоксил-8-стеарат (моностеарат ПЭГ 400), полиоксил-2-стеарат, полиоксил-4-стеарат, полиоксил-6-стеарат, полиоксил-12-стеарат, полиоксил-20-стеарат, полиоксил-30-стеарат, полиоксил-40-стеарат, полиоксил-50-стеарат, полиоксил-100-стеарат, полиоксил-150-стеарат и полиоксил-4-дистеарат, полиоксил-8-дистеарат, полиоксил-12-дистеарат, полиоксил-32-дистеарат, полиоксил-150-дистеарат.

Подходящие диапазоны концентрации компонентов в композиции могут представлять собой, например, от 5 мМ до 25 мМ для гистидина (соответственно от 10 мМ до 15 мМ для гистидина), от 10 мМ до 50 мМ для NaCl (соответственно от 30 мМ до 40 мМ для NaCl) и от 0,001 до 0,01% для Твина® 80 (соответственно от 0,005% до 0,008% для Твина® 80), и возможно от 0,5 мМ до 5 мМ для бензамидина (соответственно от 1 мМ до 2 мМ для бензамидина).

В настоящем описании термин «мутеины» относится к аналогам фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, в которых один или более аминокислотных остатков встречающихся в природе компонентов фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C заменены другими аминокислотными остатками или делетированы, или один или более аминокислотных остатков добавлены к исходной последовательности фактора крови без значительного изменения активности полученных продуктов по сравнению с исходным фактором крови. Данные мутеины получают путем известного синтеза и/или методами сайт-направленного мутагенеза, или любым другим известным подходящим методом.

Мутеины согласно настоящему изобретению включают белки, кодируемые нуклеиновой кислотой, такой как ДНК или РНК, которая гибридизуется в ДНК или РНК, кодирующую фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Xa, фактор XI, фактор VIIa, фактор V, фактор XIII, фактор фон Виллебранда или протеин C согласно настоящему изобретению, в жестких условиях. Термин «жесткие условия» относится к условиям гибридизации и последующей промывки, которые специалисты в данной области техники обычно называют «жесткими» (Ausubel *et al., Current Protocols in Molecular Biology*, Interscience, N.Y., sections 63 and 6.4 (1987, 1992); Sambrook et al. (Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y (1989)).

Без ограничения, примеры жестких условий включают условия промывки на 12-20°C ниже рассчитанной Tm исследуемого гибрида, например, в 2xSSC и 0,5% SDS в течение 5 минут, 2xSSC и 0,1% SDS в течение 15 минут; 0,1 раза SSC и 0,5% SDS при 37°C в течение 30-60 минут, а затем 0,1xSSC и 0,5% SDS при 68°C в течение 30-60 минут. Специалисту в данной области техники понятно, что жесткость условий также зависит от длины последовательностей ДНК, олигонуклеотидных зондов (таких как 10-40 оснований) или смешанных олигонуклеотидных зондов. Если используют смешанные зонды, предпочтительным является использование хлорида тетраметиламмония (TMAC) вместо SSC.

Любой такой мутеин предпочтительно содержит такую последовательность аминокислот, в достаточной мере дублирующую последовательность фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, чтобы демонстрировать по существу схожую или даже лучшую активность по сравнению с фактором VII, фактором VIII, фактором IX, фактором X, фактором Xa, фактором XI, фактором VIIa, фактором V, фактором XIII, фактором фон Виллебранда или протеином C.

Одной характерной активностью фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C является его способность участвовать в каскаде свертывания крови и анализах для детектирования фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C. Пока мутеин обладает существенной активностью фактора крови, можно считать, что он обладает по существу схожей с фактором крови активностью. Таким образом, можно определить, обладает ли конкретный мутеин по меньшей мере по существу такой же активностью, что и фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Xa, фактор XI, фактора VIIa, фактор V, фактор XIII, фактор фон Виллебранда или протеин C, путем проведения рутинных экспериментов, включающих подвергание такого мутеина анализам, описанным в настоящем документе.

В предпочтительном варианте реализации любой такой мутеин обладает по меньшей мере 40% идентичностью или гомологией с аминокислотной последовательностью фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C. Более предпочтительно, он обладает по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью или гомологией с ней.

Идентичность отражает отношения между двумя или более полипептидными последовательностями, или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, определяемые путем сравнения указанных последовательностей. В целом, идентичность относится к точному соответствию нуклеотида нуклеотиду или аминокислоты аминокислоте двух полинуклеотидов или двух полипептидных последовательностей соответственно по всей длине сравниваемых последовательностей.

Для последовательностей, у которых нет точного соответствия, может быть определен «процент идентичности». Как правило, две сравниваемые последовательности выравнивают для обеспечения максимальной корреляции между указанными последовательностями. Это может включать встраивание «гэпов» либо в одну, либо в обе последовательности для увеличения степени выравнивания. Процент идентичности может быть определен по всей длине каждой из сравниваемых последовательностей (так называемое глобальное выравнивание), что особенно подходит для последовательностей одинаковой или очень схожей длины, или на более короткой определенной длине (так называемое локальное выравнивание), что больше подходит для последовательностей неравной длины.

Способы сравнения идентичности и гомологии двух или более последовательностей хорошо известны в данной области техники. Так, например, программы, доступные в Висконсинском пакете программ для анализа последовательностей (Wisconsin Sequence Analysis Package), версия 9.1 (Devereux, et al., Nucleic acids Research, 12: 387 (1984)), например, программы BESTFIT и GAP могут быть использованы для определения процента идентичности двух полинуклеотидов и процента идентичности, и процента гомологии двух полипептидных последовательностей. В BESTFIT используется алгоритм «локальной гомологии» Смита (Smith) и Уотермана (Waterman) (*Advances in Applied Mathematics,* 2; 482-489 (1981)), и данная программа обнаруживает одну область наибольшего сходства двух последовательностей. В данной области техники также известны другие программы для определения идентичности и/или сходства последовательностей, например, семейство программ BLAST (Atschul *et al., J. Molec. Biol.*, 215: 403 (1990)), доступное через

домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации (NCBI) на www.ncbi.nlm.nih.gov, и FASTA (Pearson W R, *Methods in Enzymology,* 183: 63-98 (1990)).

Мутеины фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, включают ограниченный набор по существу соответствующих последовательностей в качестве пептидов замены, которые могут быть обычным способом получены специалистом в данной области техники без проведения лишних экспериментов, на основе идей и руководства, представленного в настоящем описании.

Предпочтительными изменениями для мутеинов согласно настоящему изобретению являются изменения, которые известны как «консервативные» замены. Консервативные замены аминокислот в факторе VII, факторе VIII, факторе IX, факторе X, факторе Xa, факторе XI, факторе VIIa, факторе V, факторе XIII, факторе фон Виллебранда или протеине C могут включать синонимичные аминокислоты в пределах группы, которые обладают достаточно схожими физико-химическими свойствами, что замена между членами данной группы позволит сохранить биологическую функцию молекулы. Очевидно, что встраивания и делеции аминокислот также могут быть произведены в вышеопределенных последовательностях без изменения их функции, особенно, если данные встраивания или делеции затрагивают лишь несколько аминокислот, например, меньше тридцати и предпочтительно меньше десяти, и не приводят к удалению или замене аминокислот, имеющих критическое значение для функциональной конформации, например, остатков цистеина. Белки и мутеины, полученные посредством таких делеций и/или встраиваний, включены в объем настоящего изобретения.

Таким образом, аминокислоты глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин часто могут быть заменены друг другом (аминокислоты, содержащие алифатические боковые цепи). Из данных возможных замен предпочтительным является использование глицина и аланина для замены друг друга (поскольку они содержат относительно короткие боковые цепи), и использование валина, лейцина и изолейцина для замены друг от друга (поскольку они содержат более крупные алифатические боковые цепи, которые являются гидрофобными). Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены друг другом, включают: фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, содержащие ароматические боковые цепи); лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, содержащие основные боковые цепи); аспартат и глутамат (аминокислоты, содержащие кислотные боковые цепи); аспарагин и глутамин (аминокислоты, содержащие амидные боковые цепи); и цистеин и метионин (аминокислоты, содержащие серосодержащие боковые цепи). Замены такого рода часто называются «консервативными» или «полуконсервативными» заменами аминокислот.

Замены аминокислот в отношении последовательности гибридного белка согласно настоящему изобретению могут быть произведены с использованием любого подходящего метода, например, путем использования сайт-направленного мутагенеза.

Следует учитывать, что замены или встраивания аминокислот в пределах объема настоящего изобретения могут быть произведены с использованием встречающихся в природе или не встречающихся в природе аминокислот. Независимо от того, используют ли природные аминокислоты или синтетические аминокислоты, предпочтительным является присутствие только L-аминокислот.

Кроме того, также можно использовать гибридные белки, содержащие фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор Xa, фактор XI, фактора VIIa, фактор V, фактор XIII, фактор фон Виллебранда или протеин C, слитый с другим пептидом или фрагментом белка, при условии, что гибридный белок сохраняет активность фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C. В настоящем описании термин «гибридный белок» в общих чертах означает один или более белков, соединенных друг с другом химическим путем, включая водородные связи или солевые мостики, или пептидными связями путем белкового синтеза, или тем и другим.

В настоящем описании термин «функциональные производные» включает производные фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C и их мутеинов, которые могут быть получены из функциональных групп, присутствующих в виде боковых цепей в остатках или присоединенных к N- или C-концевым группам, способами, известными в данной области техники, и включены в настоящее изобретение до тех пор, пока они остаются фармацевтически приемлемыми, т.е. они не устраняют активность белка, которая по существу схожа с активностью факторов крови, и не придают токсические свойства композициям, их содержащим.

Данные производные могут, например, включать алифатические сложные эфиры карбоксильных групп, амиды карбоксильных групп, полученные по реакции с аммиаком или с первичными или вторичными аминами, N-ацильные производные свободных аминогрупп аминокислотных остатков, образованные ацильными фрагментами (например, алканоильной или карбоксильной ароильной группами) или O-ацильные производные свободных гидроксильных групп (например, гидроксильных групп серильных или треонильных остатков), образованные ацильными фрагментами, включая, например, гликозилирование доступных гидроксильных остатков.

«Активный фрагмент фактора крови» согласно настоящему изобретению может представлять собой фрагмент фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, или мутеина, определенного в настоящем описании. Термин «фрагмент»

относится к любой подгруппе молекулы, т.е. более короткому пептиду, который сохраняет желаемую биологическую активность. Фрагменты могут быть легко получены путем удаления аминокислот с любого конца молекулы фактора крови и тестирования полученного фрагмента на предмет его свойств, как описано в настоящем документе. Известны протеазы для удаления одной аминокислоты за раз либо с N-конца, либо с C-конца полипептида, поэтому определение фрагментов, сохраняющих желаемую биологическую активность, включает только проведение рутинных экспериментов.

В качестве активных фракций фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, их мутеинов и активных фрагментов, настоящее изобретение также включает любой фрагмент или любые предшественники полипептидной цепи молекулы белка отдельно или вместе с ассоциированными молекулами или связанными с ними остатками, например, остатками сахаров или фосфатными остатками, или агрегатами самой молекулы белка или остатков сахаров, при условии, что указанная фракция обладает активностью, по существу схожей с активностью фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C.

В настоящем описании термин «соли» относится как к солям карбоксильных групп, так и к солям присоединения кислоты аминогрупп молекулы фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, или их аналогов. Соли карбоксильной группы могут быть образованы способами, известными в данной области техники, и включают неорганические соли, например, соли натрия, кальция, аммония, железа (III) или цинка и т.п., и соли, образованные органическими основаниями, такие как соли, образованные, например, аминами, такими как триэтаноламин, аргинин или лизин, пиперидин, прокаин и т.п. Соли присоединения кислоты включают, например, соли, образованные минеральными кислотами, такими как, например, соляная кислота или серная кислота, и соли, образованные органическими кислотами, такими как, например, уксусная кислота или щавелевая кислота. Конечно, любые такие соли должны сохранять биологическую активность факторов крови, описанных в настоящем документе.

В настоящем описании термин «площадь под кривой» или «ППК» в контексте введения терапевтического агента пациенту определяется как общая площадь под кривой, описывающая концентрацию лекарственного средства в большом круге кровообращения у пациента как функцию времени от нуля до бесконечности. В настоящем описании термин «клиренс» или «почечный клиренс» определяется как объем плазмы, содержащий количество лекарственного средства, выделяемое в минуту.

В настоящем описании термин «период полувыведения» или «t1/2» в контексте введения пептидного лекарственного средства пациенту определяется как время, необходимое для уменьшения концентрации лекарственного средства в плазме у пациента в два раза. Для пептидного лекарственного средства может существовать более одного периода полувыведения в зависимости от множественных механизмов клиренса, перераспределения и других механизмов, хорошо известных в данной области техники. Обычно периоды полувыведения альфа и бета определяются таким образом, что альфа-фаза связана с перераспределением, а бета-фаза связана с клиренсом. Однако в случае белковых лекарственных средств, которые в основном ограничены кровотоком, могут существовать по меньшей мере два периода полувыведения, связанных с клиренсом. Точное влияние пегилирования на период полувыведения альфа-фазы и бета-фазы будет варьироваться в зависимости от размера и других параметров, как хорошо известно в данной области техники. Дополнительное объяснение термина «период полувыведения» можно найти в Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101-120).

В настоящем описании термин «время удержания» в контексте введения пептидного лекарственного средства пациенту определяется как среднее время, в течение которого лекарственное средство остается в организме пациента после введения дозы.

В настоящем описании термин «иммуногенность» в контексте введения пептидного лекарственного средства пациенту определяется как склонность данного пептидного лекарственного средства вызывать иммунный ответ у пациента после введения дозы или после повторного введения дозы.

В настоящем описании термин «размеры молекул» означает массу, размер и/или форму агента. Таким образом, «увеличение размеров молекул путем модификации» означает, что размеры молекул увеличивают так, что агент является слишком большим по физическому размеру для прохождения через стенки кровеносных сосудов в кровоток. Однако размеры молекул необязательно означают увеличение молекулярной массы, если, например, агент «укорачивают» до модификации. Термин «размеры молекул» может включать молекулярную массу, размер и/или конформацию при условии, что модифицированный агент сохраняет активность и не может попадать непосредственно в кровеносные сосуды, не будучи доставленным туда лимфатической системой.

В настоящем описании термин «подкожная доставка» или «подкожное введение» означает такую доставку любым подходящим способом, при которой терапевтический агент доставляют через кожу непосредственно в подкожное пространство.

В настоящем описании термин «скорректированная доза» в контексте подкожных доз модифицированного агента означает внутривенную дозу модифицированного агента, умноженную на дробь C_{max} при внутривенном введении/C_{max} при подкожном введении. Как объяснено в настоящем документе, способы согласно настоящему изобретению позволяют вводить дозы реже и/или вводить пациенту более высокие дозы по сравнению с немодифицированным или модифицированным агентом, вводимым внутривенно. Термин «нескорректированная доза» в контексте подкожных доз означает, что доставляют такую же дозу модифицированного агента, которую доставляли бы внутривенно.

В настоящем описании термин «подкожное пространство» означает соединительную ткань под кожей. Он исключает кровеносные сосуды, кровоток и внутренние органы.

Термин «нативное состояние» означает состояние, в котором агент существует до модификации, и состояние, в котором его, как правило, внутривенно вводят пациенту в фармацевтически приемлемой форме.

Лекарственные формы для подкожного введения согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый разбавитель, адъювант или носитель. Лекарственные формы для подкожного введения, подходящие для подкожного введения, могут включать водный и/или неводный стерильный раствор (растворы) для инъекций, который может содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические факторы и растворенные вещества, которые делают состав по существу изотоничным с кровью предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты и загустители. Вспомогательные вещества, которые могут быть использованы для растворов для инъекций, включают воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла, например. Композиции могут быть представлены в однодозовых или многодозовых емкостях, например, герметичных ампулах и виалах, и могут храниться в высушенном методом сублимации (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Растворы и суспензии для инъекций для немедленного применения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

В целом, лекарственные формы для подкожного введения могут содержать консерванты, солюбилизирующие агенты, стабилизирующие агенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, красители, соли (сами активные вещества согласно настоящему изобретению могут быть получены в форме фармацевтически приемлемой соли), буферы или антиоксиданты. Они также могут содержать терапевтически активные агенты в дополнение к веществу согласно настоящему изобретению. Лекарственные

формы для подкожного введения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с фармацевтически приемлемыми разбавителями, адъювантами или носителями. Такие вспомогательные вещества могут включать, но не ограничиваются ими, физиологический раствор, буферный физиологический раствор (например, фосфатный буферный раствор), декстрозу, липосомы, воду, глицерин, этанол и их комбинации.

Подкожное введение лекарственных форм для подкожного введения, описанных в настоящем документе, можно осуществлять любым эффективным удобным способом, эффективным для лечения заболевания у пациента. Лекарственная форма может представлять собой жидкую форму или твердую форму. Жидкие формы могут быть готовыми к применению или получены в виде концентратов, которые затем разбавляют перед подкожным введением. Твердые формы могут быть соответственно восстановлены в соответствующем носителе для подкожного введения. В терапии или в качестве профилактического средства активный агент, вводимый индивидууму в виде композиции для инъекций, может представлять собой, например, стерильную водную дисперсию, предпочтительно изотоническую.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена жидкая лекарственная форма модифицированного фактора свертывания крови для подкожного введения не больше одного раза в месяц, при этом указанная лекарственная форма имеет C_{max}, составляющую по меньшей мере 10% и не более 90% от достигаемой путем внутривенного введения модифицированного фактора крови, для применения для лечения нарушения свертываемости крови.

Данный аспект настоящего изобретения также включает способы лечения заболевания или повреждения, связанного со свертываемостью крови, у субъекта, включающие введение лекарственной формы модифицированного фактора свертывания крови, определенного в настоящем описании, подкожно нуждающемуся в этом субъекту.

Следовательно, согласно настоящему изобретению также предложено применение модифицированного фактора свертывания крови для изготовления лекарственного средства, включающего лекарственную форму, определенную в настоящем описании, для лечения нарушения свертываемости крови у субъекта, при этом указанное лекарственное средство предназначено для подкожного введения и имеет C_{max}, составляющую по меньшей мере 10% и не более 90% от достигаемой путем внутривенного введения модифицированного фактора крови. Соответствующим образом, C_{max} составляет от 20% до 80% или от 30% до 70%, или от 40% до 60%. В одном из вариантов реализации C_{max} составляет от 75 до 80%, и фактор свертывания крови может представлять собой FVII. В другом варианте реализации C_{max} составляет от 10% до 25%, и фактор свертывания крови может представлять собой FVIII. В другом

варианте реализации C_{max} составляет от 40% до 60%, и фактор свертывания крови может представлять собой FIX.

Заболевания или нарушения свертываемости крови могут характеризоваться потерей функции фактора свертывания крови или выработкой аутоантител. Примеры заболеваний, связанных со свертываемостью крови, включают гемофилию A и гемофилию B.

Фактор VIIa может можно применять для лечения эпизодов кровотечения при гемофилии A или B, или для лечения пациентов, у которых выработались ингибирующие антитела к FVIII или IX, соответственно. Фактор VIII можно применять для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией A, и фактор IX можно применять для лечения пациентов с гемофилией B.

В настоящем описании термин «лечение» включает любой режим, который может оказать полезный эффект для млекопитающего, представляющего собой человека, или млекопитающего, не относящегося к человеку. Лечение «млекопитающих, не относящихся к человеку» распространяется на лечение домашних млекопитающих, включая лошадей и животных-компаньонов (например, кошек и собак), и сельскохозяйственных животных, включая членов семейств овец, коз, свиней, коров и лошадей. Лечение может быть в отношении какого-либо имеющегося состояния или нарушения, или может быть профилактическим (превентивное лечение). Лечение может являться лечением наследственного или приобретенного заболевания. Лечение может являться лечением острого или хронического состояния.

Лекарственные формы для подкожного введения согласно настоящему изобретению можно применять отдельно или совместно с другими соединениями, такими как терапевтические соединения или молекулы, например, противовоспалительными лекарственными средствами, анальгезирующими средствами или антибиотиками, или другими фармацевтически активными агентами, которые могут способствовать или усиливать активность фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C, например, другим фактором свертывания крови. Такое введение совместно с другими соединениями может быть одновременным, раздельным или последовательным. Компоненты могут быть получены в форме набора, который может содержать инструкции при необходимости.

Уровни активности в каскаде свертывания крови могут быть измерены с помощью любого подходящего анализа, например, теста на определение времени свертывания цельной крови (WBCT) или активированного частичного тромбопластинового времени (APTT).

Тест на определение времени свертывания цельной крови (WBCT) позволяет измерить время, необходимое для формирования цельной кровью сгустка, во внешней среде, как правило, стеклянной пробирке или чашке.

Тест на определение активированного частичного тромбопластинового времени (APTT) позволяет измерить показатель части пути свертывания крови. Данное время аномально увеличено при гемофилии и внутривенной терапии гепарином. Для определения APTT требуется несколько миллилитров крови из вены. Время APTT является мерой одной части системы свертывания, известной как «внутренний путь». Значение APTT представляет собой время в секундах протекания конкретного процесса свертывания в лабораторном тесте. Данный результат всегда сравнивают с «контрольным» образцом нормальной крови. Если тестируемый образец требует больше времени, чем контрольный образец, это указывает на снижение функции свертывания во внутреннем пути. В общемедицинской практике терапия, как правило, направлена на диапазон APTT порядка от 45 до 70 секунд, но данное значение также может быть выражено в виде соотношения тестового и нормального значения, например, 1,5 раза относительного нормального значения. Большое APTT в отсутствии лечения гепарином может быть обусловлено гемофилией, что может потребовать проведения дополнительных тестов.

Согласно настоящему изобретению также предложен набор компонентов, содержащий лекарственную форму для подкожного введения согласно настоящему изобретению и носитель для введения, включая растворы для инъекций для подкожного введения, при этом указанный набор соответственно содержит инструкции по их применению.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложена лекарственная форма фармацевтической композиции модифицированного фактора свертывания крови (соответственно фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон Виллебранда или протеина C) для подкожного введения, которая в случае, когда изготовлена в форме для подкожного введения субъекту, представляет собой лекарственную форму для введения не больше одного раза в месяц, достаточную для сохранения времени свертывания цельной крови у указанного субъекта меньше 15 минут. Дозированная лекарственная форма может соответственно иметь C_{max}, составляющую по меньшей мере 10% и не больше 90% по сравнению с эквивалентной исходной лекарственной формой при введении внутривенно.

Следовательно, согласно настоящему изобретению предложена лекарственная форма фармацевтической композиции модифицированного фактора свертывания крови, выбранного из группы, состоящей из фактора VII, фактора VIII, фактора IX, фактора X, фактора Xa, фактора XI, фактора VIIa, фактора V, фактора XIII, фактора фон

Виллебранда или протеина С, для подкожного введения, которая в случае, когда изготовлена в форме для подкожного введения субъекту, представляет собой лекарственную форму для введения не больше одного раза в месяц, достаточную для сохранения времени свертывания цельной крови у указанного субъекта меньше 12 минут.

Следовательно, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложена лекарственная форма фармацевтической композиции, содержащей от 25 до 50 МЕ/кг пегилированного фактора свертывания крови, выбранного из группы, состоящей из фактора VIIa, фактора VIII и фактора IX, для подкожного введения не больше одного раза в неделю.

Жидкая лекарственная форма согласно настоящему изобретению может содержать модифицированный фактор свертывания крови, определенный в настоящем описании, для подкожного введения не больше одного раза в месяц, при этом указанная лекарственная форма имеет C_{max}, составляющую по меньшей мере 10% и не больше 90%, для применения для лечения нарушения свертываемости крови.

Такие композиции могут найти особое применение в способах лечения заболевания или повреждения, связанного со свертываемостью крови, у субъекта, включающих введение лекарственной формы фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению подкожно нуждающемуся в этом субъекту.

Лекарственные формы согласно настоящему изобретению при введении подкожно демонстрируют биодоступность и эффективность, сопоставимую с уровнями соответствующего модифицированного аналога фактора свертывания крови при введении внутривенно как по циркулирующему титру, так и по коагулирующей активности.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена лекарственная форма для подкожного введения, содержащая фактор свертывания крови, определенный в настоящем описании, модифицированный с присоединением линейной монодисперсной молекулы полиэтиленгликоля через трехуглеродный мостиковый фрагмент к одинарной дисульфидной связи в белке.

Жидкая лекарственная форма согласно настоящему изобретению может быть получена путем приготовления состава конъюгированного с ПЭГ фактора свертывания крови в водном растворе, забуференном до физиологического значения, и в присутствии неионогенного поверхностно-активного вещества и возможно стабилизатора.

Предпочтительные признаки второго и последующих аспектов настоящего изобретения являются такими же как для первого аспекта с учетом необходимых изменений.

Было показано, что воздействие продукта модифицированного агента согласно настоящему изобретению превосходит воздействие этого же продукта

модифицированного агента, доставляемого внутривенно. Воздействие продукта может быть определено как улучшение, например, WBCT. Оно определяется как исходное WBCT, деленное на WBCT в конкретный момент времени. С использованием данного способа, агенты, представляющие собой модифицированные факторы свертывания крови, доставляемые подкожно, согласованно демонстрировали большее воздействие продукта, чем тот же продукт, доставляемый внутривенно в тот же момент времени.

Согласно настоящему изобретению в результате подкожного введения терапевтических агентов, которые были модифицированы, например, путем присоединения биосовместимого полимера, возникает пониженный иммунный ответ. Данный эффект диаметрально противоположен тому, что мог бы ожидать до настоящего изобретения специалист в области введения фармацевтических составов. Например, в области составов факторов крови общепринято, что введение немодифицированного фактора крови подкожно, как можно было бы ожидать, стимулирует иммуногенный ответ (образование ингибиторов FVIII) или запускает иммунный ответ имеющейся популяцией ингибиторов FVIII.

Относительный иммунный ответ на факторы свертывания крови может быть измерен в единицах Бетезда. Единица Бетезда (BU) является мерой активности ингибиторов свертывания крови. В соответствии с Practical Haemostasis «1 единица Бетезда (BU) определяется как количество ингибитора в образце плазмы, которое будет нейтрализовать 50% 1 единицы фактора VIII:C в нормальной плазме после 2 часов инкубации при 37°C». (Schumacher, Harold Robert (2000). *Handbook of Hematologic Pathology*. Informa Health Care, p. 583).

В настоящем изобретении был обнаружен очень неожиданный результат. Для уменьшения возникновения иммунных (ингибиторных) ответов предложено выбрать подкожное введение, при котором уровень иммунного ответа напрямую связан с уровнем системного воздействия. Путем обеспечения подкожной доставки можно радикально снижать C_{max} и тем самым понижать иммунный ответ.

В качестве примера, настоящее изобретение описывает неожиданный эффект депо, обнаруживаемый в случае факторов крови, когда они конъюгированы с полимерами, такими как ПЭГ. Более того, результаты показывают, что можно устанавливать скорость, с которой факторы крови становятся доступными из подкожного пространства, путем управления уровнем гидратации, задаваемым белку размером (или количеством) ПЭГ.

Из результатов, представленных в настоящей заявке, можно видеть, что терапевтические агенты, модифицированные одной полимерной цепью, демонстрируют более низкую скорость попадания в плазму, чем соответствующие диконъюгированные формы, в которых присоединены две полимерные цепи.

Другими словами, в моноконъюгированных продуктах, по-видимому, бóльшая часть белка является открытой по сравнению с диконъюгированными продуктами. Данное обстоятельство означает, что конъюгированные формы более высокого порядка будут более диспергируемыми в воде и, следовательно, будут иметь высокую скорость попадания через лимфатические сосуды в плазму.

Поэтому удивительно, что для достижения наибольшей продолжительности высвобождения из депо требуется меньшая степень модификации. Не будучи связанными рамками конкретной теории, с рациональной точки зрения это можно объяснить меньшей степенью модификации, которая «предоставляет» некоторое количество терапевтического агента подкожной ткани, которая обеспечивает низкую скорость диффузии через лимфу. Более высокая степень модификации, напротив, полностью защищает терапевтический агент, позволяя продукту быстро попадать в кровообращение.

В целом, наблюдают очень удивительный суммарный эффект, в соответствии с которым комбинация модификации с последующей подкожной доставкой приводит к наблюдаемому 35-кратному увеличению кажущегося периода полувыведения после подкожного (п/к) введения.

Наконец, в целом можно видеть, что лучшую биодоступность демонстрируют конъюгированные формы более высокого порядка, что подтверждает, что более высокий уровень модификации и уровни гидратации способствуют более высокой степени подвижности и, следовательно, биодоступности.

Все признаки каждого аспекта применимы ко всем другим аспектам настоящего изобретения с учетом необходимых изменений.

В настоящем описании также упомянуты следующие чертежи, на которых:

На фиг.1 показан каскад свертывания крови. Сокращения: ВМК - высокомолекулярный кининоген; ПК - прекалликреин; ФЛ - фосфолипид.

На фиг.2 показаны этапы, включенные в химический процесс конъюгации с биополимером, специфичным в отношении дисульфида, с использованием пегилирующего реагента в качестве примера конъюгирующего реагента (из Shaunak *et al.* in *Nat. Chem. Biol.* 2006; 2(6):312-313).

На фиг.3 показано время свертывания цельной крови (WBCT) после подкожного (п/к) введения ПЭГhrFIX субъекту, представляющему собой собаку 1, и hrFIX - субъекту, представляющему собой собаку 2.

На фиг.4 показаны значения APTT (активированное частичное тромбопластиновое время) с течением временем после подкожного введения.

На фиг.5 показано APTT в сохраненной плазме после подкожного введения.

На фиг.6 показаны значения APTT относительно исходных после подкожного введения.

На фиг.7 показано WBCT субъекта, представляющего собой собаку 9, после подкожного введения 25 МЕ/кг.

На фиг.8 показаны ФК характеристики и параметры FVIIa после 200 мкг/кг rFVIIa.

На фиг.9 показаны ФК характеристики и параметры FVIIa после 800 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa.

На фиг.10 показаны ФК характеристики и параметры FVIIa после 1600 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa.

На фиг.11 показана концентрация FVIII в плазме (все собаки).

На фиг.12 показана концентрация FVIII в плазме (только собаки, которым вводили подкожно).

На фиг.13 показаны данные иммунной системы (значение в единицах Бетезда) для ПЭГFVIII, вводимого подкожно (п/к) по сравнению с внутривенным (в/в) введением, количество субъектов обозначено «n».

Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не являются ограничивающими. Ссылки на подкожное введение дозированных лекарственных форм согласно настоящему изобретению приведены в виде п/к (п.к.), а на внутривенное введение – в виде в/в (в.в.).

Пример 1: Получение лекарственных форм и введение подкожно

Исследование включает оценку биодоступности и эффективности hrFIX после подкожного введения. «Оголенный» (непегилированный) hrFIX сравнивали с его пегилированным аналогом как по циркулирующему титру, так и по коагулирующей активности.

Пегилированный hrFIX 10 кДа получали согласно стандартной методике, в соответствии с которой линейный монодисперсный полиэтиленгликоль массой 10 кДа конъюгировали через трехуглеродный мостик с одинарной дисульфидной связью.

Тестируемый препарат готовили для введения путем получения подходящего водного раствора, забуференного до pH 6,8 10 мМ гистидином, 40 мМ NaCl и 0,005% Твином® 80. Добавляли 1 мМ бензамидин в качестве стабилизатора.

Исходя из того, что исследования разведения hrFIX показали время свертывания, сопоставимое с ПЭГrFIX в 25% разведении, локализованная активность для данного исследования составляла 4 Х белковых эквивалента. Контрольный препарат был поставлен в виде лиофилизированного порошка и его готовили для введения в соответствии с прилагаемыми инструкциями по восстановлению. Носитель для доставки был идентичен описанному выше для ПЭГ.

В качестве дополнения к данному исследованию было решено исследовать возможность подкожного (п/к) введения rFIX. Перспектива того, что пегилированная форма rFIX подходит для подкожного введения, возникла в результате

вышеприведенного наблюдения, что ПЭГ обеспечивал эффект экранирования белка. Ранее подкожный путь считался непригодным для FIX, поскольку было опасение, что это усилит выработку антител, и не перейдет в значимые количества в крови.

В данной части исследования 50 МЕ/кг ПЭГhrFIX вводили подкожно дополнительному подопытному животному (собака 1) и сравнивали с 2 подкожными введениями «оголенного» hrFIX двум другим субъектам исследования, а именно собаке 6 и собаке 2. соответственно.

В данном конкретном представлении каждое животное демонстрировало несколько отличающееся исходное значение, поэтому для простоты сравнения уровень APTT до введения приводили к 1. Собака 1 и собака 2 являлись субъектами исследования в предыдущем исследовании ПЭГrFIX в январе 2010 года, из которого были доступны для сравнения зафиксированные титры в плазме после внутривенного введения.

Образцы крови забирали регулярно с отслеживанием уменьшения титра и влияния на свертывание крови. Таблица 1 представляет собой краткий перечень титров циркулирующего FIX, измеренных через 22 часа после внутривенного введения.

Таблица 1

Субъект	**Препарат**	**Доза (МЕ/кг)**	**Титр**
Собака 1	ПЭГhrFIX	50	9,9
Собака 2	Бенефикс®	50	5,6
Собака 3	hrFIX	50	5,1
Собака 4	ПЭГhrFIX	50	9,7
Собака 5	ПЭГhrFIX	100	11,1
Собака 6	ПЭГhrFIX	100	10,2
Собака 7	ПЭГhrFIX	150	17,6
Собака 8	ПЭГhrFIX	150	75,5

В таблице 2 показано сравнение измеренного титра циркулирующего FIX через 22 часа после подкожного (п/к) введения.

Таблица 2

Субъект	**Препарат**	**Доза (МЕ/кг)**	**Титр**
Собака 1	ПЭГhrFIX	50	7,8
Собака 6	hrFIX	50	1,7
Собака 2	Бенефикс®	25	не определен

Можно видеть, что 25 МЕ/кг Бенефикса® подкожным путем были недетектируемыми в кровообращении, а 50 МЕ/кг ПЭГhrFIX были едва детектируемыми

в плазме. В отличие от этого подкожное введение ПЭГhrFIX было на уровне (7,8), приближающемся к уровню внутривенно вводимого продукта (9,9).

Затем исследовали влияние данных титров на коррекцию времени свертывания. В первую очередь фиксировали время свертывания цельной крови. WBCT после подкожного введения показано в таблице 3 и на фиг.3. Кроме того, также фиксировали APTT на Hemochron® Junior и значения представлены в таблице 4 ниже (цельная цитратная кровь) и на фиг.4 после подкожного введения. Значения APTT в сохраненных образцах плазмы показаны в таблице 5 и на фиг.5 также после подкожного введения.

Таблица 3

Время свертывания цельной крови (минуты)** после подкожного введения		
Часы	Собака 1 (ПЭГhrFIX)	Собака 2 (hrFIX)
6	4	45*
22	3,5	45
48	8	45
72	9,5	45
120	4	45
144	4	45
168	45	45
192	45	45
216	45	45

*Примечание – 45 минут представляли собой время, в которое прекращали наблюдение из-за отсутствия образования сгустка в соответствии со стандартными процедурами.
** обе собаки представляли собой ранее не подверженных экспериментам собак, то есть они ранее не были подвержены воздействию FIX.

Таблица 4

APTT в цитратной крови после подкожного введения		
	Собака 1 (ПЭГhrFIX)	**Собака 2 (hrFIX)**
До	279,7	225,1
6	99,4	375,5
22	75,6	328,7
48	88,6	
72	90,1	261,7
120	124,4	274,5

АРТТ в цитратной крови после подкожного введения		
	Собака 1 (ПЭГhrFIX)	**Собака 2 (hrFIX)**
144	138,9	301
168	300	372,5
192	254,2	
216	300	298,3

Таблица 5

АРТТ после подкожного введения		
	Собака 1 (ПЭГhrFIX)	Собака 2 (hrFIX)
До	67,2	66,3
6	44,6	71,9
22	40,2	61,1
48	45,3	64,7
72	43,9	60,7
120	49,6	59,6
144	-	58,5
168	55,4	64,9

Фиг.6 – данный набор данных ясно показывает, что «оголенный» rFIX (практически) не является биодоступным в результате подкожной инъекции. Это совершенно ожидаемо исходя из опубликованной литературы и на основе общих знаний в данной области техники. Тогда тем более удивительно, что такие высокие титры циркулирующего rFIX можно детектировать после подкожной инъекции ПЭГhrFIX. Действительно, в таблице 10 можно видеть, что приблизительно 80% вводимого путем подкожной инъекции ПЭГhrFIX доступны для участия в гемостатическом контроле.

Наибольшим является отличие в измеренном времени свертывания, как WBCT, так и АРТТ для rFIX едва корректируются, тогда как ПЭГhrFIX в результате подкожной инъекции сразу же корректирует время свертывания. Продолжительность гемостаза по данным этих измерений увеличивается до приблизительно 1 недели в результате однократной подкожной инъекции 50 МЕ/кг.

Пример 2: подкожное (п/к) введение hrFIX собаке 9

Учитывая успех вышеописанных исследований подкожного введения, было решено осуществить дополнительное однократное подкожное введение ПЭГhrFIX и подобным образом следить за гемостатическим контролем в течение продолжительного

периода времени. Выбранным субъектом исследования являлась ранее не подверженная экспериментам собака 9 для исследования влияния нейтрализующих антител на подкожный путь введения.

Исследованиям фактора крови человека у собак мешает ответ иммунной системы собак на белок человека. Следовательно, в исследованиях с собаками rFIX человека представляет собой ксенобелок, и следует ожидать появления нейтрализующих антител в определенный момент после введения тестируемого препарата. Действительно, когда субъектам исследования повторно вводили факторы крови человека, выработка антител была более выраженной и более быстрой. Как следствие, субъекты, представляющие собой собаку 1 и собаку 7, после подкожного введения демонстрировали укороченный период гемостаза.

Субъект исследований, представляющий собой собаку 9, являлся ранее не подверженным экспериментам животным, и получал маленькую дозу подкожно и, следовательно, демонстрировал точную продолжительную защиту, которую пегилированные факторы крови согласно настоящему изобретению могут обеспечить. Поскольку собака 9 ранее не была подвержена воздействию факторов крови человека, наблюдали точный основной (и очень удивительный) результат.

На фиг.7, а также в таблице 6 ниже представлены результаты для WBCT после подкожного (п/к) введения 25 МЕ/кг пегилированного IB1001 собаке 9 в дозе 1 мл (объем 1 мл).

Таблица 6

Время (часы)	WBCT (минуты)	Титр FIX (% нормы)	APTT (секунды)
До	45		67,2
6	1,75	0,68	53,8
24	6	2,46	50,9
48	9,5	2,42	49,8
72	3	1,69	55,6
94	9	1,24	57,7
118	5,5	1,13	53,2
142	8	0,66	56,3
168	9	0,28	61,4
189	18	не определен	64,3
216	22,5	не определен	47,7
240	25	не определен	59,7

Время (часы)	WBCT (минуты)	Титр FIX (% нормы)	APTT (секунды)
336			61,4

Пример 3: сравнительный пример

Сравнение внутривенного и подкожного введения FIX и ПЭГ-FIX.

Таблица 7*

Животное	Доза МЕ/кг	Тип	в/в C_{max} нг/мл	п/к C_{max} нг/мл	п/к/в/в %Cmax
Бигль	200	BFIX	4517,5	550,7	12%
Собака с гемофилией B (HB)	200	BFIX	7916	658,3	8,2%

* - из McCarthy et al Thromb. Haemost. 87(5) 824-830, (2002).

Таблица 8

Животное	Доза МЕ/кг	Тип	в/в % нормы	п/к % нормы	п/к/в/в %Cmax
Собака 1	50	ПЭГFIX	9,9	7,8	78,8%
Собака 7	50	ПЭГFIX		7,8	
Собака 6	50	hrFIX		1,7	
Собака 2	25	BFIX		не определен	

BFIX = Бенефикс®

ПЭГFIX = ПЭГ-hrFIX

Результаты показывают C_{max} введенной подкожно дозы, составляющую 78,8% от введенной внутривенно дозы. Процентные значения для внутривенного и подкожного введения по сравнению с нормальными оказались низкими, но на самом деле они являются экспериментальными артефактами. Предполагается, что FIX в каждом случае центрифугируют с клетками, когда получают образцы. Можно видеть, что значение, составляющее 9,9%, для введенной внутривенно дозы на самом деле представляет собой хороший результат. Следовательно, сравнение с 7,8% для введенной подкожно дозы является благоприятным, как показывает приведенное рассчитанное значение C_{max}.

Выводы:

Введение hrFIX путем подкожной инъекции как 25, так и 50 МЕ/кг приводило к едва детектируемому циркулирующему титру и не корректировало гемофилию у субъектов, представляющих собой собак.

В отличие от вышеуказанного, подкожное введение дозы 50 МЕ/кг ПЭГhrFIX обуславливало приблизительно 80% биодоступность и корректировало время свертывания так, что оно находилось в пределах нормального диапазона на протяжении 1 недели.

Пример 4: фактор VIIa с ПЭГ массой 20 кДа

В данном примере описано исследование биодоступности ПЭГFVIIa фактора крови в результате подкожной инъекции. Двух страдающих гемофилией собак (HB) лечили обладающими одинаковой эффективностью количествами ПЭГFVIIa в момент времени 0; одну внутривенно (в/в), одну подкожно (п/к). Забирали образцы крови и выделяли плазму для измерения на предмет белка FVIIa. В таблице результатов показана биодоступность в результате подкожного введения, составляющая 89,5%.

Таблица 9

	Титры пегилированного фактора крови VIIa в плазме		
Время (часы)	в/в	п/к	
0	9,5	9,5	
4	167,5	73,9	(макс.)
12	122,2	62,4	
24	45,7	57,5	
48	23,1	39,6	
72	9,3	22,5	
Среднее	62,88	44,23	
Макс./Среднее	2,66	1,67	

Наличие ПЭГ обеспечивает растворимость в воде, которая способствует подвижности в лимфатических сосудах. Данные показывают устойчивую контролируемую инфузию FVIIa, а не болюсный пик и впадину, обуславливаемые внутривенной инъекцией.

Площадь под кривой показывает 89,5% биодоступность для пегилированного FVIIa и более стационарный уровень FVIIa при доставке подкожно.

Пример 5: лекарственные продукты ПЭГFVIII

Для сравнения приведена ссылка на Когенэйт® ФС (коммерчески доступный рекомбинантный FVIII). В большом количестве использовано пегилированное вспомогательное вещество, Твин® 80.

Полисорбат, Твин® 80, имеет молекулярную массу 1310 г/моль, из которых 880 г получены в результате пегилирования (общее число мономерных звеньев 20, каждое из которых содержит 44 г/моль, (CH2-CH2-O)).

Рассчитывают таким образом:

Молярный эквивалент длины ПЭГ:

Источник: фармакопейная статья на препарат Взятый пример флакон 250 МЕ

Молекулярная масса FVIII	3,00E+05 г/моль
МЕ/г	4,00+06 МЕ/г
МЕ/флакон	2,50E+02 МЕ/флакон
Объемы виалы	2,50E+00 мл/флакон
Концентрация полисорбата	6,40E-05 г/мл
Молекулярная масса полисорбата	1,31E+03 г/моль
Молекулярная масса ПЭГ на моль полисорбата	880 г/моль

Таблица 10

FVIII Когенэйт®			Полисорбат		
4,00E+06	МЕ/г			1,31E+03	г/моль
3,00E+05	г/моль			6,40E-05	г/мл
1,2E+12	МЕ/моль			2,50E+00	мл/флакон
				1,60E-04	г/флакон
2,50E+0,2	МЕ/флакон				
2,08E-10	моль/флакон			1,22E-07	моль/флакон

Соотношение Твин®/FVIII 5,86E+02

Эквивалент молек. массы ПЭГ 5,16E+05

Следовательно, в Когенэйт® ФС каждая молекула FVIII содержит эквивалент связанного ПЭГ 516 кДа. Для сравнения дозированная лекарственная форма ПЭГFVIII, полученная согласно настоящему изобретению, содержит один ПЭГ 20 кДа.

Выводы: на основе «дозы-для-дозы» присутствует 25,8-кратное уменьшение полиэтиленгликоля; с учетом того, что дозированную лекарственную форму ПЭГ-FVIII согласно настоящему изобретению можно вводить один раз в неделю в сравнении с профилактическим применением Когенэйт® три раза в неделю, происходит потенциальное общее уменьшение, представляющее собой приблизительно 80-кратное уменьшение, введения ПЭГ; и количество ПЭГ, вводимое посредством дозированной

лекарственной формы FVIII согласно настоящему изобретению в течение периода введения дозы, составляет 1,25% от количества, вводимого посредством Когенэйт®.

Пример 6: подкожное введение FVIIa

Задача данного исследования заключалась в исследовании фармакокинетики пегилированного TheraPEG и непегилированного TheraPEG рекомбинантного FVIIa человека (TheraPEGrFVIIa и FVIIa соответственно) после внутривенного и подкожного введения у страдающих гемофилией B собак.

Пегилирование TheraPEG трансгенного FVIIa (rFVIIa) осуществляли в соответствии с WO 2011/135308. TheraPEGrFVIIa поставляли в место проведения исследования в виде лиофильного препарата несколькими партиями, который при восстановлении водой высокой степени чистоты давал 1 мг/мл TheraPEGrFVIIa в физиологически приемлемом буфере, сохраняющем активность FVIIa.

Экспериментальные животные представляли собой помесь собак Лхаса апсо-басенджи с врожденной тяжелой гемофилией B, вызванной делецией 5 пар оснований и транзицией C→T в гене *F9*, приводящей к раннему стоп-кодону и нестабильному транскрипту FIX. Перед введением доз всех собак исследовали для проверки нормального состояния здоровья, включая полный химический анализ крови, биохимический анализ сыворотки, фибриноген, полученные из фибриногена пептиды (FDP), тромбиновое время и анализ мочи. Вводимые внутривенно (в/в) лекарственные средства вводили в виде болюсной инъекции в головную вену. Вводимые подкожно (п/к) дозы вводили между лопатками в виде однократной дозы.

Отдельные партии TheraPEGrFVIIa восстанавливали, а затем объединяли для получения раствора с однократной дозой, используемого для введения животным, как описано в таблице 11.

Таблица 11

Субъект-собака и код (пол)	Масса тела собаки (кг)	Лекарственное средство	Путь введения дозы	Уровень дозы (мкг/кг)	Величина дозы (мг)
Собака 9 HB1 (самец)	5,4	TheraPEG-rFVIIa	п/к	800	4,32
Собака 3 HB2 (самец)	11,4	rFVIIa	п/к	200	2,28
Собака 5 HB3 (самка)	5,6	TheraPEG-rFVIIa	в/в	800	4,48

Субъект-собака и код (пол)	Масса тела собаки (кг)	Лекарственное средство	Путь введения дозы	Уровень дозы (мкг/кг)	Величина дозы (мг)
Собака 7 HB4 (самка)	10,0	rFVIIa	в/в	200	2,0
Собака 10 HB5 (самка)	5,5	TheraPEG-rFVIIa	в/в	1600	8,8
Собака 11 HB6 (самец)	4,8	TheraPEG-rFVIIa	п/к	1600	7,68

Согласно протоколу 5 мл образец крови необходимо было забирать у каждой собаки в следующие моменты времени:

до введения лекарственного средства и через 10, 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 и 240 часов после введения дозы.

4 мл образца крови переносили в пробирку, содержащую антикоагулянт - 0,109М трехзамещенный цитрат натрия (9:1 об./об.), на льду. Плазму получали путем центрифугирования оставшейся цитратной крови, и полученные образцы плазмы хранили в аликвотах при -80°C. Аликвоту плазмы анализировали на предмет концентрации FVIIa путем твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Анализ ИФА Stago Asserachrom VII:Ag представляет собой процедуру иммуноферментного анализа для количественного определения концентрации фактора VII/VIIa в образцах плазмы. Данный анализ представляет собой ИФА «сэндвич»-типа, включающий лунки микротитровального планшета, предварительно покрытые антителом кролика к FVII человека. Поскольку указанное антитело обладает аффинностью к FVIIa, отличной от аффинности к ПЭГ-FVIIa, стандартную кривую получали путем разведения белка, соответствующего FVIIa, который присутствует в тестируемой плазме, т.е. rFVIIa (от 0,78 до 50 нг/мл) для анализа плазмы собак, которым вводили rFVIIa, или ПЭГ-rFVIIa (от 0,78 до 50 нг/мл) для анализа плазмы собак, которым вводили ПЭГ-rFVIIa.

Образцы плазмы разводили до соответствующей концентрации с попаданием на стандартную кривую. Разбавленные образцы плазмы и стандартные образцы загружали и инкубировали при комнатной температуре перед промывкой и последующим

проявлением конъюгатом антител кролика к FVII человека с HRP и OPD (колориметрический субстрат HRP). Планшет прочитывали при 492 нм и концентрацию тестируемых образцов (нг/мл) получали из стандартной кривой.

Таблица 12

Путь введения дозы	**Tmax (ч)**	**Cmax (нг/мл)**	**ППК(0-t) (нг.ч/мл)**	**ППК(0-∞) (нг.ч/мл)**	**Скорость (/ч)**	**Период полу-выведения (ч)**	**Биодост. (%)**
в/в	0,16	1643	2467	2534	0,2994	2,3	100
п/к	7,5	31,3	276	-	-	-	11

Таблица 13

Путь введения дозы	**Tmax (ч)**	**Cmax (нг/мл)**	**ППК(0-t) (нг.ч/мл)**	**ППК(0-∞) (нг.ч/мл)**	**Скорость (/ч)**	**Период полу-выведения (ч)**	**Биодост. (%)**
в/в	0,5	19372	128305	129646	0,0256	27,0	100
п/к	12,0	1378	84960	87139	0,0262	26,5	67

Таблица 14

Путь введения дозы	**Tmax (ч)**	**Cmax (нг/мл)**	**ППК(0-t) (нг.ч/мл)**	**ППК(0-∞) (нг.ч/мл)**	**Скорость (/ч)**	**Период полу-выведения (ч)**	**Биодост. (%)**
в/в	0,5	26609	236116	240449	0,050	13,8	100
п/к	24	2030	107728	108454	0,038	18,3	45,6

Фармакокинетика

Характеристики и ФК параметры внутривенного и подкожного введения для 200 мкг/кг FVIIa, 800 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa и 1600 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa представлены на фиг.8, 9 и 10 (таблица 12, таблица 13 и таблица 14). Было обнаружено, что период полувыведения TheraPEG-rFVIIa составлял от 14 до 27 часов, что является очевидным увеличением по сравнению с 2,3-часовым периодом полувыведения непегилированного rFVIIa. ППК в/в дозы 1600 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa была в 1,8 раза больше ППК в/в дозы 800 мкг/кг. Однако ППК п/к дозы 1600 мкг/кг была только в 1,2 раза больше ППК дозы 800 мкг/кг. Это отражено в расчетах биодоступности, составляющей 67% и 45% для доз 800 мкг/кг и 1600 мкг/кг соответственно, что представляло собой значительное

увеличение по сравнению с 11% биодоступностью при подкожном введении, наблюдаемой для непегилированного rFVIIa.

ППК для в/в дозы 800 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa в 84 раза больше ППК после 200 мкг/кг непегилированного rFVIIa внутривенно, и ППК для п/к дозы 800 мкг/кг TheraPEG-rFVIIa в 300 раз больше ППК п/к дозы 200 мкг/кг непегилированного rFVIIa.

Пример 7: подкожное введение FVIII

Задача данного исследования заключалась в исследовании фармакокинетики и фармакодинамики пегилированного TheraPEG полученного из плазмы FVIII (TheraPEG-pdFVIII) при введении внутривенно и подкожно собакам, страдающим гемофилией A. TheraPEG-pdFVIII получали, как описано в WO 2011/135307, с использованием линейного ПЭГ массой 20 кДа и дополнительно очищали с получением очищенного TheraPEG-pdFVIII.

Экспериментальные животные представляли собой помесь собак породы борзая, которые страдали врожденной тяжелой гемофилией A и которым ранее вводили плазму собак для лечения спонтанных кровотечений, но которые ранее не получали лечение FVIII человека. Перед введением доз всех собак исследовали для проверки нормального состояния здоровья, включая полный химический анализ крови, биохимический анализ сыворотки, фибриноген, полученные из фибриногена пептиды, тромбиновое время и анализ мочи.

В таблице 15 показана масса тела каждой собаки и дозы FVIII, которые вводили. Каждая собака получала однократную дозу либо TheraPEG-pdFVIII в более высокой (приблизительно 0,14 мг/кг) или более низкой (0,07 мг/кг) дозе, либо непегилированный pdFVIII в дозе 0,03 мг/кг. Внутривенное (в/в) введение осуществляли в виде болюсной дозы через головную вену. Подкожное (п/к) введение осуществляли в виде однократной дозы между лопатками.

Таблица 15

Тести-руемый препарат	Путь введения дозы	Субъект -собака (пол) и код	Масса тела (кг)	Конц. FVIII (мг/мл)	Объем дозы (мл)	Общая величина дозы FVIII (мг)	Доза (мг FVIII/кг)

TheraPEG-pdFVIII	п/к	Собака 12 (самка) НА1	21,8	0,211	14	2,954	0,135
TheraPEG-pdFVIII	п/к	Собака 13 (самец) НА2	26,6	0,235	16	3,76	0,141
TheraPEG-pdFVIII	в/в	Собака 14 (самка) НА3	20,6	0,211	14	2,954	0,143
TheraPEG-pdFVIII	в/в	Собака 15 (самец) НА4	31	0,235	17,1	4,019	0,130
TheraPEG-pdFVIII (низкая доза)	п/к	Собака 16 (самец) НА6	28	0,273	7,0	1,911	0,068
Непегили-рованный pdFVIII	п/к	Собака 17 (самка) НА5	27,4	0,090*	9,0	0,810	0,030

Согласно протоколу образец крови необходимо было забирать у каждой собаки в следующие моменты времени. До введения лекарственного средства и через 10, 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 и 240 часов после введения дозы. Цельную кровь (не цитратную) использовали для анализа свертывания цельной крови и анализа активированного времени свертывания. Оставшийся образец крови переносили в пробирки, содержащие антикоагулянт - 0,109М трехзамещенный цитрат натрия (9:1 об./об.), на льду. Анализ на определение активированного частичного тромбопластинового времени проводили с использованием цитратной крови. Плазму получали путем центрифугирования цитратной крови, и полученные образцы плазмы хранили в аликвотах при -80°С для анализа ИФА антигена FVIII.

Анализ на определение времени свертывания цельной крови (WBCT)

Образцы крови распределяли по 2 вакуумным пробиркам (2 X 0,5 мл) и внимательно наблюдали с периодическим тщательным выравниванием пробирки до

обнаружения сгустка по остановке тока в полностью горизонтальном положении. Затем наблюдали качество сгустка путем удерживания пробирки в полностью перевернутом положении. WBCT фиксировали как среднее значение суммарного времени от извлечения образца до визуального наблюдения сгустка крови для обоих образцов, и также отмечали качество сгустка в перевернутом положении.

Активированное время свертывания (ACT) и активированное частичное тромбопластиновое время (APTT)

Тесты на определение ACT и APTT проводили с использованием анализатора свертывания Haemachron Jr (International Technidyne Corps.) в соответствии с инструкциями производителя.

Концентрацию антигена FVIII в образцах плазмы определяли путем ИФА с использованием набора Visulize FVIII antigen kit от Affinity Biologicals (Анкастер, Онтарио, Канада) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Время свертывания цельной крови (WBCT)

Гемостаз (WBCT <12 минут) поддерживался у всех собак, которые получили более высокую дозу TheraPEG-pdFVIII (HA1-4), в течение 80-100 часов. По-видимому, не было отличия в характеристиках WBCT между внутривенным и подкожным введением. Более низкая доза TheraPEG-pdFVIII (HA6), вводимая подкожно, поддерживала гемостаз в течение 56-75 часов. В отличие от этого, хотя непегилированный FVIII, вводимый подкожно, уменьшал WBCT, он не приводил к устойчивому WBCT меньше 12 минут.

Активированное время свертывания (ACT)

ACT уменьшалось до нормального диапазона меньше 200 секунд у всех собак, которые получили более высокую дозу TheraPEG-pdFVIII (HA1-4), в течение приблизительно 80 часов после введения дозы. Не было отличия в характеристиках ACT между внутривенным и подкожным введением.

Более низкая доза TheraPEG-pdFVIII (HA6), вводимая подкожно, сохраняла ACT меньше 200 секунд в течение по меньшей мере 36 часов. В отличие от этого, хотя непегилированный FVIII, вводимый подкожно, уменьшал ACT, он не приводил к устойчивому ACT меньше 200 секунд.

Активированное частичное тромбопластиновое время (APTT)

APTT уменьшалось до времени меньше 60 секунд у всех собак, которые получили более высокую дозу TheraPEG-pdFVIII (HA1-4), в течение приблизительно 60 часов после введения дозы. Не было отличия в характеристиках APTT между внутривенным и подкожным введением.

Более низкая доза TheraPEG-pdFVIII (HA6), вводимая подкожно, сохраняла APTT на уровне меньше 60 секунд в течение по меньшей мере 40 часов. В отличие от этого,

хотя непегилированный FVIII, вводимый подкожно, уменьшал АРТТ, наименьшее время АРТТ составляло 80 секунд. Причина, по которой АРТТ для данного индивидуума оставалось ниже исходного значения на протяжении всего исследования после введения дозы, неясна, но может быть обусловлена вариацией среди собак.

Концентрации FVIII в плазме и фармакокинетика

Концентрация FVIII в плазме в зависимости от времени у всех собак показана на фиг.11. Данные для собак, которым вводили дозы только внутривенно, представлены на фиг.12. Необработанные данные приведены в таблицах 23-28. Ключевые ФК параметры представлены в таблице 16.

Период полувыведения TheraPEG-FVIII, вводимого подкожно, составлял 18,3 часов и 16,6 часов для НА1 и 2 соответственно. При введении внутривенно период полувыведения был несколько короче и составлял 15,2 часов и 13,9 часов для НА3 и 4 соответственно. Рассчитывали биодоступность, и она составляла 32% после подкожного введения. Концентрации FVIII после подкожного введения непегилированного FVIII (НА5) были в основном ниже уровня количественного определения и, следовательно, ФК РК не могли быть рассчитаны.

Таблица 16

Доза (мг/кг)	**Код собаки**	**T_{max} (ч)**	**C_{max} (% нормы)**	**$ППК_{0-t}$ (% нормы.ч)**	**$AUC_{0-\infty}$ (% нормы.ч)**	**λ_z (/ч)**	**$t_{1/2}$ (ч)**
0,135	НА1 (п/к)	8,00	31,20	871,4	1066,8	0,0379	18,3
0,141	НА2 (п/к)	8,00	32,80	1085,3	1171,7	0,0417	16,6
0,143	НА3 (в/в)	0,16	176,40	2929,8	3698,0	0,0456	15,2
0,130	НА4 (в/в)	0,16	179,20	3302,8	3522,8	0,0500	13,9
0,068	НА6 (п/к)	4,00	9,01	345,2	510,1*	0,0143*	48,4*

* Приблизительное значение из-за вариабельности данных.

Выводы

Подкожная поставка более высокой дозы TheraPEG-FVIII приводила к гемостатическому контролю в течение 80-100 часов после однократной дозы, измеряемому с помощью WBCT, АРТТ и АСТ. Характеристики при подкожном введении в данных анализах не отличались от данных характеристик эквивалентной дозы

TheraPEG-FVIII, вводимой внутривенно. Это наглядно демонстрировало возможность доставки TheraPEG-FVIII подкожно.

Период полувыведения TheraPEG-pdFVIII находился в диапазоне от 13,9 до 18,3 часов. Это демонстрирует явное увеличение периода полувыведения по сравнению с продаваемым рекомбинантным FVIII, который по сообщениям составляет 7-11 часов, у собак с гемофилией A (Karpf *et al.*,*Haemophilia* 17, 5 (2011)). Следовательно, TheraPEG-FVIII был не только биодоступным при подкожном введении, но также демонстрировал увеличенный период полувыведения.

ФК характеристики FVIII после подкожного введения TheraPEG-pdFVIII включали сильно уменьшенную C_{max} и ППК по сравнению с внутривенным введением, и определяли, что биодоступность составляла 32%. Однако на данном уровне дозы вследствие характера «медленного высвобождения» ФК кривой, воздействие поддерживалось выше 5% нормального уровня после подкожного введения в течение схожего количества времени, как после в/в дозы, что, вероятно, объясняет эквивалентные функциональные ответы. Уменьшение C_{max} и ППК в сочетании с увеличением продолжительности действия для доставляемого подкожно TheraPEG-FVIII подчеркнуло возможные дополнительные признаки безопасности данного продукта и варианты введения доз.

Подкожное введение непегилированного FVIII приводило к отсутствию детектируемого FVIII в плазме, и хотя время свертывания уменьшалось, не наблюдали устойчивого поддержания гемостаза. Это продемонстрировало, что непегилированный FVIII имел очень низкую биодоступность при подкожном введении, но что очень маленькие количества FVIII могут влиять на гемостаз. В отличие от непегилированного FVIII, низкая доза TheraPEG-pdFVIII приводила к уровням в плазме до 9% нормы, и гемостаз поддерживался в течение 56-75 часов. Следовательно, присоединение TheraPEG к pdFVIII приводило к большей биодоступности и функциональному ответу при введении подкожно. В заключение, данное исследование ясно показало, что пегилирование FVIII с помощью TheraPEG приводит к более совершенному продукту, который можно вводить подкожно и который обладает увеличенной продолжительностью действия.

Таблица 17

Собака 12 HA1 (ПЭГ-pdFVIII подкожно)

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
0,00	40,00	186,95	378,00	0
0,16	31,00	178,4	400	0
0,50	32,00	168,1	319	0

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
1,00	8,50	114,1	229	0
2,00	8,75	81,3	241	0
3,50	7,00	57,3	177	7,8
8,00	7,50	40,4	167	31,2
12,00	6,50	51,4	183	29,4
20,00	5,25	33,4	184	23,4
26,50	5,50	37,3	194	21,4
33,50	5,80	40,4	196	15,4
48,50	6,40	81,3	205	7,4
58,00	8,13	58,5	183	3,8
72,00	9,00	71,5	188	0,1
94,00	13,00	119,2	275	0
117,75	29,00	146,4	400	0
145,50	33,00	174,3	386	
170,00	31,75	137	360	
398,00	32,65	140,8	365	
696,00	30,00	133,4	347	

Таблица 18

Собака 13 HA2 (ПЭГ-pdFVIII подкожно)

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
0,00	36,50	117,50	367,00	0
0,16	12,50	79,8	265	0
0,50	7,50	52,5	197	0
1,00	7,50	39,3	181	4,4
2,16	7,00	40,4	179	12,8
4,00	7,75	33,4	172	24,6
8,00	6,00	30,6	168	32,8
11,00	6,75	35,3	177	26,6
21,00	5,00	36,3	185	29,8
24,75	7,50	32,4	173	26,4
32,50	7,75	51,4	186	18,8
46,00	7,25	47,9	183	9,2
52,25	8,00	50,2	185	1,4

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
72,75	8,00	56,1	213	3,6
97,00	19,75	122,7	314	0
120,50	24,00	174,3	400	
143,50	26,00	176,3	371	
165,00	33,50	306,4	400	

Таблица 19

Собака 14 НА3 (ПЭГ-pdFVIII внутривенно)

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
0,00	24,00	239,45		0
0,16	4,00	38,3	174	176,4
0,50	4,00	38,3	158	169,4
1,00	4,50	32,4	174	172,2
2,00	5,50	37,3	180	154,8
3,50	6,50	31,5	179	140,6
8,00	4,50	44,6	160	116,4
12,00	4,90	29,6	166	98,6
20,00	5,00	28,7	176	70,2
26,50	6,00	42,5	171	52,2
33,50	6,75	37,3	163	35
48,50	7,63	43,5	179	13,6
58,00	7,13	44,6	184	4
72,00	6,00		209	0
94,00	9,00		234	0
117,75	19,00	112,4	320	0
145,50	26,25	176,3	347	
170,00	29,25	114,1	333	
398,00	40,00	142,6	362	
696,00	30,00	53,7	294	

Таблица 20

Собака 15 НА4 (ПЭГ-pdFVIII внутривенно)

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
0,00	26,25	84,2	396	0
0,16	40,00	77	227	179,2
0,50	22,50	62,3	168	170,8
1,00	8,25	33,4	151	166,2
2,16	6,00	24,4	158	151,8
4,00	5,25	30,6	165	129,8
8,00	7,50	29,6	150	115,6
11,00	8,50	31,5	157	100,2
21,00	6,50	35,3	185	68,8
24,75	7,00	34,3	162	55
32,50	7,00	38,3	177	35,8
46,00	6,25	43,5	174	18,4
52,25	6,75	45,7	167	11
72,75	7,00	53,7	203	0
97,00	22,00	79,8	334	0
120,50	20,50	102,5	356	
143,50	23,50	178,4	306	
165,00	34,50	114,1	371	

Таблица 21

Собака 17 HA5 (pdFVIII подкожно)

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
0,00	31	104,2		0
0,166	21	137	351	0
0,5	31,5	100,9	311	0
1	19,25	105,8	268	0
2	16	98,5	268	0
4	18	84,2	261	0
8	13,25	105,8	238	0,186
12	13	79,8	200	0
18	12,5	93,1	230	0
24	10,25	82,7	226	0

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
36	15,5	84,2	247	0
48	18,5	122,7	237	0
56	19,25	148,3	278	0
72	23		364	0,489
96	25,5	122,7	347	0
120		109,1	328	0
192	37,00	87,1	334	0
432	40	128	375	0

Таблица 22

Собака 16 HA6 (ПЭГ-pdFVIII подкожно, низкая доза)

Время (ч)	WBCT (мин.)	APTT (мин.)	ACT (мин.)	ELISA (% нормы)
0,00	31,75	81,3	321	0
0,166	39	104,2		0
0,5	33,5	115,8	298	0
1	12,5	94,2	224	0
2	8,25	82,7	190	0,131
4	9	62,3	168	9,006
8	9	44,5	188	8,621
12	7,5	40,4	156	3,053
18	7	49,1	179	5,148
24	7,75	57,3	168	6,167
36	11,5	62,3	180	6,553
48	8,75	68,8	217	2,419
56	15	74,2	178	5,01
72	10,5	88,6	215	2,364
96	27	110,7	281	0
120		90,1		0
192	31,25	100,9	323	0
432	35,5	93,1	333	0

Пример 8: Иммунный ответ на подкожное введение у собак

В настоящем изобретении наблюдали наличие более низкого иммунного ответа, возникающего в результате подкожного введения. Данный эффект диаметрально противоположен тому, что мог бы ожидать до настоящего изобретения специалист в области введения факторов крови. Общепринято, что при введении подкожно существующий очень высокий уровень иммунного ответа (частота ингибитора FVIII) будет усиливаться.

В настоящем изобретении был обнаружен очень неожиданный результат. Для уменьшения возникновения иммунных (ингибиторных) ответов предложено выбрать подкожное введение, при котором уровень иммунного ответа напрямую связан с уровнем системного воздействия. Путем обеспечения подкожной доставки можно радикально снижать C_{max} и тем самым понижать иммунный ответ.

В примерах настоящего изобретения пегилированный продукт подвергали наибольшему тестированию иммунных сред, а именно в системе собаки. Можно видеть, что значения в единицах Бетезда (единицы ингибиторных количеств) являются самыми высокими и самыми ранними при введении внутривенно. Подкожная доставка, напротив, демонстрирует гораздо меньшее системное воздействие, о чем свидетельствует C_{max} и более низкий и поздний ответ Бетезда. Действительно, самое низкое значение из всех дает «оголенный» FVIII, вводимый подкожно, который почти не оказывает системного воздействия и никогда не наблюдали, чтобы он давал ингибиторное значение. См. фиг.13/таблицу 23, в которых представлены полученные данные.

Таблица 23

Краткая информация				**Единицы Бетезда**			
	Продукт и путь	**N (колич. субъектов)**	**Cmax**	До	День 7	День 14	День 30
	ПЭГFVIII в/в	2	177,8	0	0	20	17,5
	ПЭГFVIII п/к	2	32	0	0	10	17
	ПЭГFVIII п/к (низкая доза)	1	9,0	0	0	0	6
	FVIII п/к	1	0,5	0	0	0	0

Графики на фиг.13 показывают насколько сильную ингибирующую активность, стимулируемую путем лечения, обнаруживали в плазме крови с течением времени. В случае лечения путем непосредственного внутривенного введения наблюдали более быстрое появление более высокого уровня ингибиторов по сравнению с лечением подкожно, при котором «вымывание» в систему происходит медленнее и которое является менее провокационным для иммунной системы.

Пример 9: Сравнительные исследования подкожного введения у крыс

В данном примере описан неожиданный эффект депо, обнаруживаемый в случае факторов крови, когда они конъюгированы с полимерами, такими как ПЭГ. Более того, результаты показывают, что можно устанавливать скорость, с которой факторы крови становятся доступными из подкожного пространства, путем управления уровнем гидратации, задаваемым белку размером (или количеством) ПЭГ.

Относительную фармакокинетику фактора VIIa, пегилированного посредством 3 различных форм пегилирования, исследовали у субъектов, представляющих собой крыс, для сравнения их эффективности в контексте доставки из подкожного пространства.

Субъектам, представляющим собой крыс, вводили нативный, рекомбинантный фактор VIIa, а также 3 различные пегилированные формы FVIIa либо подкожно (п/к), либо путем внутривенного (в/в) введения:

a) Пегилированный с помощью TheraPEG FVIIa: FVIIa монопегилировали молекулой ПЭГ массой 20 кДа с использованием технологии «TheraPEG» компании Polytherics Ltd (как описано в иных местах и в WO 2011/135308);

b) Гликопегилированный FVIIa: FVIIa конъюгировали с ПЭГ посредством стандартной технологии гликопегилирования с получением тестируемого продукта, в котором преобладал диконъюгированный ПЭГ массой 20 кДа также с некоторыми значительными количествами продуктов ПЭГ более высокого порядка:

c) Катализируемый HATU пегилированный FVIIa: FVIIa монопегилировали ПЭГ массой 20 кДа (с использованием метода конъюгации, производного от метода, описанного в US 5644029).

TheraPEG-FVIIa

ПЭГ массой 20 кДа диспергировали до 10 мг/мл в 5 мМ фосфате Na pH 8,0, 15 мМ NaCl, 2 мМ EDTA. Затем его инкубировали при 20°C в течение 3 часов. Пробирку (5,3 мг) с FVIIa восстанавливали до 0,8 мг/мл в 20 мМ цитрате натрия pH6,0, 0,1 М NaCl, 10 мМ EDTA. Инкубировали при 20°C в течение 10 минут. Затем добавляли TCEP, 1,5 молярных эквивалента (ME) 24 мМ и 0,025 ME 0,4 мМ SeCM, и инкубировали при 20°C в течение 1 часа. Затем добавляли 2 ME активированного ПЭГ к восстановленному FVIIa. Смесь инкубировали при 20°C в течение 1 часа, а затем при 5°C в течение 17 часов. Затем осуществляли эксклюзионную хроматографию (SEC) с использованием колонки Superdex 200 в буфере для приготовления состава для очистки пегилированного FVIIa.

Для анализа продукта восстановленный rFVIIa, активированный ПЭГ, реакционную смесь и выбранные фракции Superdex (25, 30, 35, 39, 45, 51, 80) анализировали на гелях SDS-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Фракции, содержащие пегилированный FVIIa, объединяли в пул и концентрировали до приблизительно 3 мл перед лиофилизацией. Концентрированный пул SEC тестировали

путем SDS-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, анализа коагулирующей активности и анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ как до, так и после лиофилизации.

Гликопегилированный FVIIa

Виалу (5,3 мг) с rFVIIa восстанавливали в 2,5 мл MOPS-буферном растворе. Затем у восстановленного rFVIIa заменяли буфер на обессоливающей колонке PD10 на MOPS-буферный раствор и разбавляли до 1 мг/мл. rFVIIa с заменой буфера помещали на лед и добавляли 100 мМ периодат натрия до конечной концентрации 2,5 мМ. Смесь инкубировали в темноте в течение максимум 30 минут. Добавляли глицерин (50%) до конечной концентрации 3%. Затем в смеси буфер заменяли буфером, представляющим собой 0,1 М ацетат натрия, с использованием центрифужной колонки Zeba. Готовили исходный раствор 50 мг/мл Аминоокси-ПЭГ и 10МЕ данного ПЭГ добавляли к обессоленному FVIIa. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1-2 часов перед дальнейшей инкубацией в течение ночи при 4°C. Затем гликопегилированный FVIIa очищали путем хроматографии SEC, как описано выше.

Для анализа продукта выбранные фракции SEC (23, 27, 32, 35, 40 и 80) анализировали путем SDS-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Фракции, содержащие гликопегилированный FVIIa, объединяли в пул и концентрировали до приблизительно 3 мл перед лиофилизацией. Концентрированный пул SEC тестировали путем SDS-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, анализа коагулирующей активности и анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ как до, так и после лиофилизации.

HATU ПЭГ-FVIIa

Пробирку (5,3 мг) с rFVIIa восстанавливали в 2,5 мл боратного буфера, заменяли буфер на колонке PD10 на боратный буфер и разбавляли до 0,5 мг/мл. Готовили исходный раствор метокси-ПЭГ в ацетонитриле до 16 мг/мл. rFVIIa с заменой буфера активировали 1,0МЕ HATU и 2,5МЕ DIEA в течение 10 минут при комнатной температуре. После активации 8 МЕ метокси-ПЭГ добавляли к активированному rFVIIa в течение 2-5 минут. Затем реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 80-100 минут. Затем пегилированный HATU FVIIa очищали путем хроматографии SEC, как описано выше.

Для анализа продукта выбранные фракции SEC анализировали путем SDS-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Фракции, содержащие пегилированный HATU FVIIa, объединяли в пул и концентрировали до приблизительно 3 мл перед лиофилизацией. Концентрированный пул SEC тестировали путем SDS-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, анализа коагулирующей активности и анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ как до, так и после лиофилизации.

Способ

Составы в дозе 0,5 мг/кг вводили либо внутривенно, либо подкожно здоровым субъектам, представляющим собой крыс. Для внутривенного введения соответствующий объем тестируемого препарата вводили в хвостовую вену. Для подкожного введения соответствующий объем тестируемого препарата вводили в загривок путем инъекции. После введения контрольных препаратов (нативного rFVIIa) забирали образцы крови в следующие интервалы времени:

Таблица 24

Время (ч)	0,033	0,25	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	12	18	24	36	48
в/в контроль	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
п/к контроль		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

После введения тестируемых препаратов забирали образцы крови в следующие интервалы времени:

Таблица 25

Время (ч)	0,033	0,25	0,5	1	2	4	6	8	12	18	24	48	72	96	120
в/в препарат	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
п/к препарат		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

В каждый момент времени получали плазму из образца крови, и определяли концентрацию FVIIa с использованием анализа ELISA Stago Asserachrom VII:Ag. Данный анализ представляет собой процедуру иммуноферментного анализа для количественного определения концентрации фактора VII/VIIa в образцах плазмы. Данный анализ представляет собой ELISA «сэндвич»-типа, включающий лунки микротитровального планшета, предварительно покрытые антителом кролика к FVII человека. Поскольку указанное антитело обладает аффинностью к FVIIa, отличной от аффинности к ПЭГ-FVIIa, стандартную кривую получали путем разведения белка, соответствующего FVIIa, который присутствует в тестируемой плазме, т.е. rFVIIa (от 0,78 до 50 нг/мл) для анализа плазмы крыс, которым вводили rFVIIa, или ПЭГ-rFVIIa (от 0,78 до 50 нг/мл) для анализа плазмы крыс, которым вводили ПЭГ-rFVIIa.

Образцы плазмы разводили до соответствующей концентрации с попаданием на стандартную кривую. Разбавленные образцы плазмы и стандартные образцы загружали и инкубировали при комнатной температуре перед промывкой и последующим проявлением конъюгатом антитела кролика к FVII человека с HRP и OPD (колориметрический субстрат HRP). Планшет прочитывали при 492 нм и концентрацию

тестируемых образцов (нг/мл) получали из стандартной кривой. Результаты исследования являются такими, как показано в таблице 26 (a) и (b), в которой представлены два пути введения: внутривенный (в/в) и подкожный (п/к) для каждой из молекул пегилированного FVIIa и контрольной группы, представлявшей собой нативный FVIIa.

Как показано в таблице 26 (a) и (b) существуют два пути введения: внутривенный (в/в) и подкожный (п/к) для каждой из молекул пегилированного FVIIa и контрольной группы, представлявшей собой нативный FVIIa.

В данном примере описан неожиданный эффект депо, обнаруживаемый в случае факторов крови, когда они конъюгированы с полимерами, такими как ПЭГ. Более того, результаты показывают, что можно устанавливать скорость, с которой факторы крови становятся доступными из подкожного пространства, путем управления уровнем гидратации, задаваемым белку размером (или количеством) ПЭГ.

Из результатов, представленных в таблице 26 (a) и (b), можно видеть, что:

- Все пегилированные белки имеют увеличенный период полувыведения из плазмы по сравнению с «оголенным» белком

Моно-ПЭГ продукты, а именно TheraPEG и пегилированные HATU белки имеют более низкую скорость попадания в плазму, чем конъюгат ди-ПЭГ (ГликоПЭГ) и, следовательно, более выраженный эффект депо. К такому заключению можно прийти путем сравнения отличий периода полувыведения при внутривенном и подкожном введении у каждого продукта.

- Для TheraPEG-FVIIa t1/2 при внутривенном введении составлял 8,68 часов, что можно сравнить с 23,2 часами для этого же продукта, вводимого подкожно. Это представляет собой 2,7-кратное увеличение, что подразумевает очень большой эффект депо для данного монопегилированного продукта.
- Подобным образом, для монопегилированного HATU ПЭГ-FVIIa t1/2 при подкожном введении обладает усиленным эффектом депо, представленным 1,7-кратным увеличением по сравнению с t1/2 при внутривенном введении (24,3/14,07)
- В отличие от этого, для сильно пегилированного продукта, гликоПЭГ-FVIIa, периоды полувыведения обоих продуктов более близки к равенству (22,3/19,34 = в 1,15), что подразумевает, что подкожное введение данного продукта оказывает малый эффект депо по сравнению с внутривенным введением.

Другими словами, монопегилированные продукты при введении подкожно, по-видимому, будут противостоять диспергированию через подкожное пространство в течение более длительного времени, чем дипегилированный продукт, что таким образом обеспечивает усиленный эффект депо. Уменьшенное количество ПЭГ в монопегилированных продуктах оставило бы бóльшую часть белка открытой; большее

покрытие ПЭГ гликопегилированного продукта сделало бы его более диспергируемым в воде в подкожном пространстве, приводя к более высокой скорости проникновения в плазму через лимфатические сосуды.

Поэтому неожиданно, что для достижения наибольшей продолжительности высвобождения из депо требуется меньшая степень пегилирования. Не будучи связанными рамками конкретной теории, с рациональной точки зрения это можно объяснить меньшим пегилированием, которое «предоставляет» некоторое количество белка подкожной ткани, которая обеспечивает низкую скорость диффузии через лимфу. Более высокая степень пегилирования, напротив, полностью защищает белок, позволяя продукту быстро попадать в кровообращение.

Это подтверждает идею о том, что модификация целевых молекул, в данном случае путем пегилирования, может быть настроена на тонкую модификацию характеристик высвобождения и тем самым концентрации продукта в крови с течением времени и его биодоступности.

В целом, наблюдают очень удивительный суммарный эффект, в соответствии с которым комбинация пегилирования с последующей подкожной доставкой приводит к наблюдаемому 35-кратному увеличению наблюдаемого периода полувыведения (от 0,66 часа для «оголенного» FVIIa до 23,2 часов после подкожного (п/к) введения).

Наконец, в целом можно видеть, что лучшую биодоступность демонстрируют более сильно пегилированные продукты, а именно гликоПЭГ, что подтверждает, что более высокие уровни ПЭГ и гидратации способствуют более высокой степени подвижности и, следовательно, биодоступности.

Таблица 26 (а)

Тестируемый препарат	**Путь введения дозы**	**Крыса**	**Tmax (ч)**	**Cmax (нг/мл)**	**ППК0-t (нг.ч/мл)**	**ППК0-∞ (нг.ч/мл)**	**t½ (ч)**
FVIIa	в/в	1	0,03	2251,8	600	624	0,55
		2	0,03	2538,3	711	728	0,75
		3	0,03	1892,3	533	561	0,66
		Среднее значение	0,03	2227,47	615	638	0,65
TheraPEG-FVIIa	в/в	4	0,03	10024,5	33598	34021	8,97
		5	0,03	8181	22051	22435	9,42
		6	0,03	10799,7	23251	23449	7,66
		Среднее значение	0,03	9668,40	26300	26635	8,68
ГликоПЭГ-FVIIa	в/в	7	0,03	6647,2	55987	57138	21,24
		8	0,03	5674,9	46702	47609	21,21
		9	0,03	6227,3	47188	47663	15,57
		Среднее значение	0,03	6183,13	49959	50803	19,34
Катализированный HATU ПЭГ-FVIIa	в/в	10	0,03	8090,5	31172	31775	13,49
		11	0,03	7586,5	30448	31003	13,07
		12	0,03	7557,1	35317	35697	15,66
		Среднее значение	0,03	7744,70	32312	32825	14,07

Таблица 26 (b)

Тестируемый препарат	**Путь введения дозы**	**Крыса**	**Tmax (ч)**	**Cmax (нг/мл)**	**ППК0-t (нг.ч/мл)**	**ППК0-∞ (нг.ч/мл)**	**t½ (ч)**	**Биодоступность (% ППК0-t п/к относительно в/в)**
TheraPEG-FVIIa	п/к	16	18,0	215,5	8015	9557	23,96	30,5
		17	12,0	117,6	3695	4839	21,15	14,0
		18	18,0	129,3	4227	5805	24,52	16,1
		Среднее значение	16,0	154,13	5312	6734	23,21	20,2
ГликоПЭГ-FVIIa	п/к	19	18,0	297,8	16868	17665	22,27	33,8
		20	24,0	234,3	12471	13456	23,55	25,0
		21	18,0	407,6	22243	22871	21,16	44,5
		Среднее значение	20,0	313,23	17194	17997	22,33	34,4
Катализированный HATU ПЭГ-FVIIa	п/к	22	18,0	224,8	10234	10996	20,85	31,7
		23	18,0	138,7	5544	6750	28,03	17,2
		24	18,0	249,1	11277	12147	24,03	34,9
		Среднее значение	18,0	204,20	9018	9964	24,30	27,9

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(для рассмотрения, от 25.09.2019 г.)

1. Применение лекарственной формы фактора свёртывания крови для лечения заболевания, связанного со свёртываемостью крови, или повреждения, где указанная лекарственная форма содержит фармацевтическую композицию фактора свёртывания крови, причём указанный фактор крови представляет собой фактор IX, конъюгированный с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ), причём указанная молекула ПЭГ конъюгирована непосредственно или опосредованно с фактором свёртывания крови через остаток серина или треонина, через остаток гидроксила на остатке сахара, через единственный остаток цистеина, через амид, N-концевую аминогруппу или карбоксильную группу, причём дозировка указанного фактора свёртывания крови составляет от 1 до 1000 МЕ/кг, причём указанную лекарственную форму вводят подкожно.

2. Способ лечения у пациента заболевания, связанного со свёртываемостью крови, или повреждения, включающий подкожное введение лекарственной формы фармацевтической композиции фактора свёртывания крови, где указанный фактор свёртывания крови представляет собой фактор IX, конъюгированный с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ), причём дозировка указанного фактора свёртывания крови составляет от 1 до 1000 МЕ/кг, и при этом указанная молекула ПЭГ конъюгирована непосредственно или опосредованно с фактором свёртывания крови через остаток серина или треонина, через остаток гидроксила на остатке сахара, через единственный остаток цистеина, через амид, N-концевую аминогруппу или карбоксильную группу.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что повторяющееся подкожное введение лекарственной формы субъекту осуществляют до снижения концентрации терапевтического агента в крови до субтерапевтического уровня.

4. Способ по любому из п. 2 или п. 3, в котором дозировка фактора свертывания крови составляет от 5 до 500 МЕ/кг.

5. Способ по любому из п. 2 или п. 3, в котором дозировка фактора свертывания крови составляет от 100 до 250 МЕ/кг.

6. Способ по любому из п. 2 или п. 3, в котором дозировка фактора свертывания крови составляет от 50 до 200 МЕ/кг.

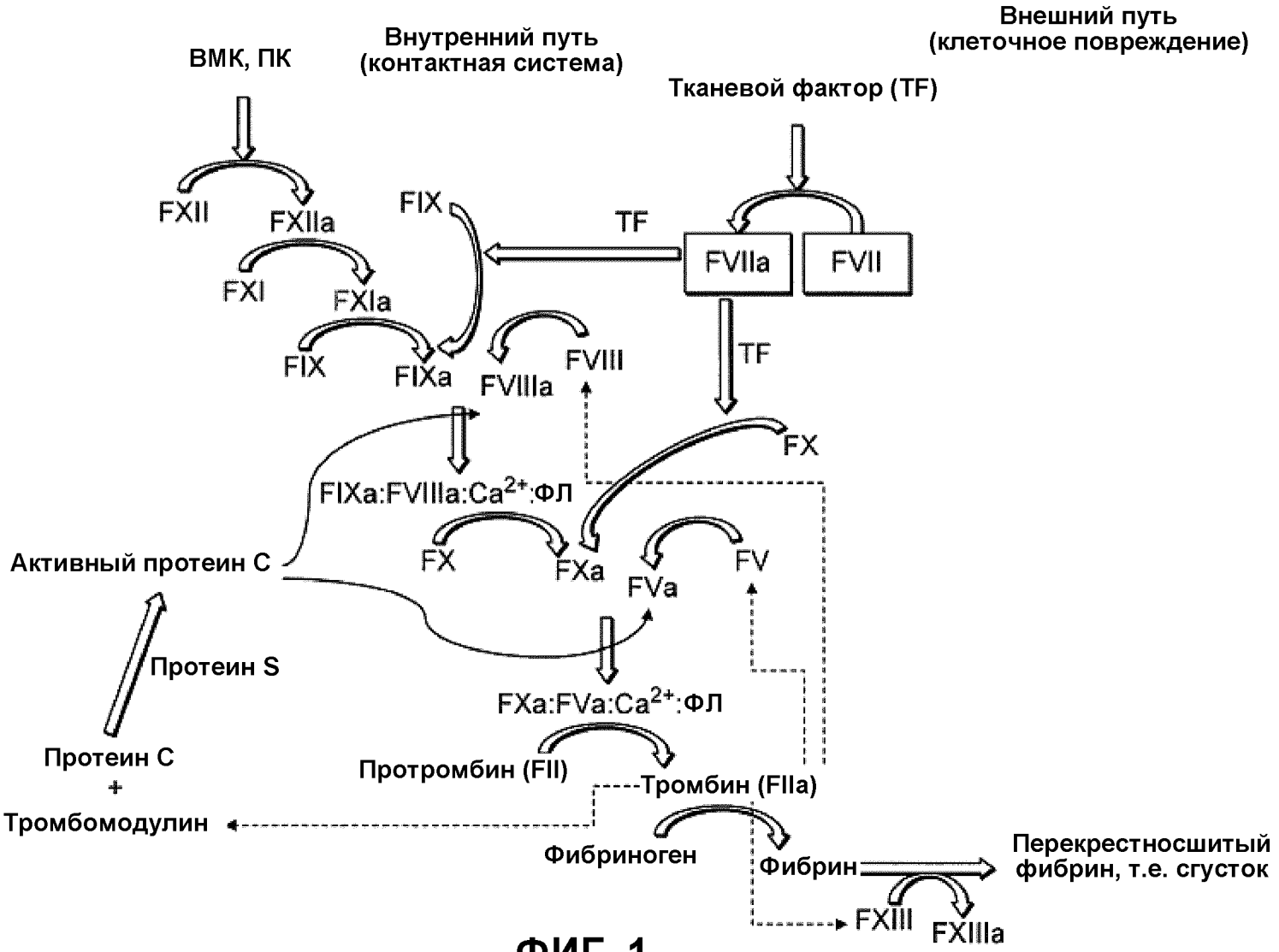
7. Способ по любому из п. 2 или п. 3, в котором указанная дозировка составляет от 25 до 50 МЕ/кг.

8. Способ по любому из п. 2 или п. 3, в котором указанная дозировка составляет от 5 до 50 МЕ/кг.

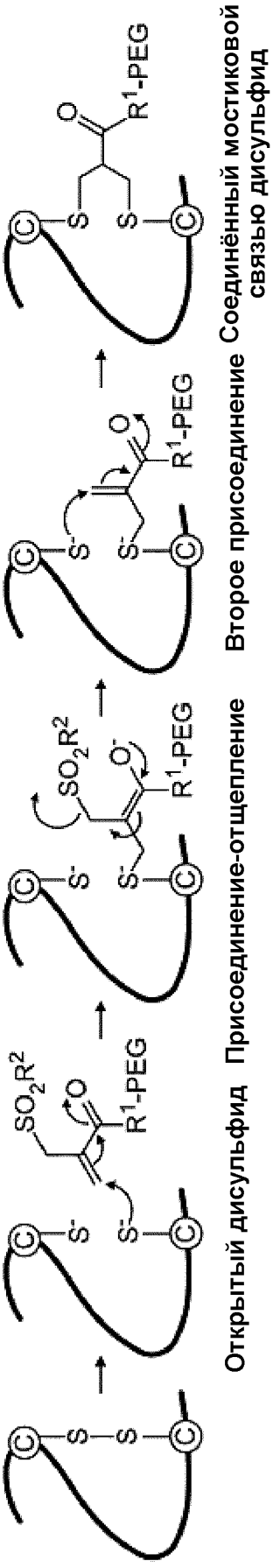
9. Способ по любому из п. 2 или п. 3, отличающийся тем, что указанная лекарственная форма предназначена для введения по меньшей мере один раз в сутки.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанная лекарственная форма предназначена для введения два раза в сутки, при этом пациент получает первую лекарственную форму при первом введении и вторую лекарственную форму при втором введении.

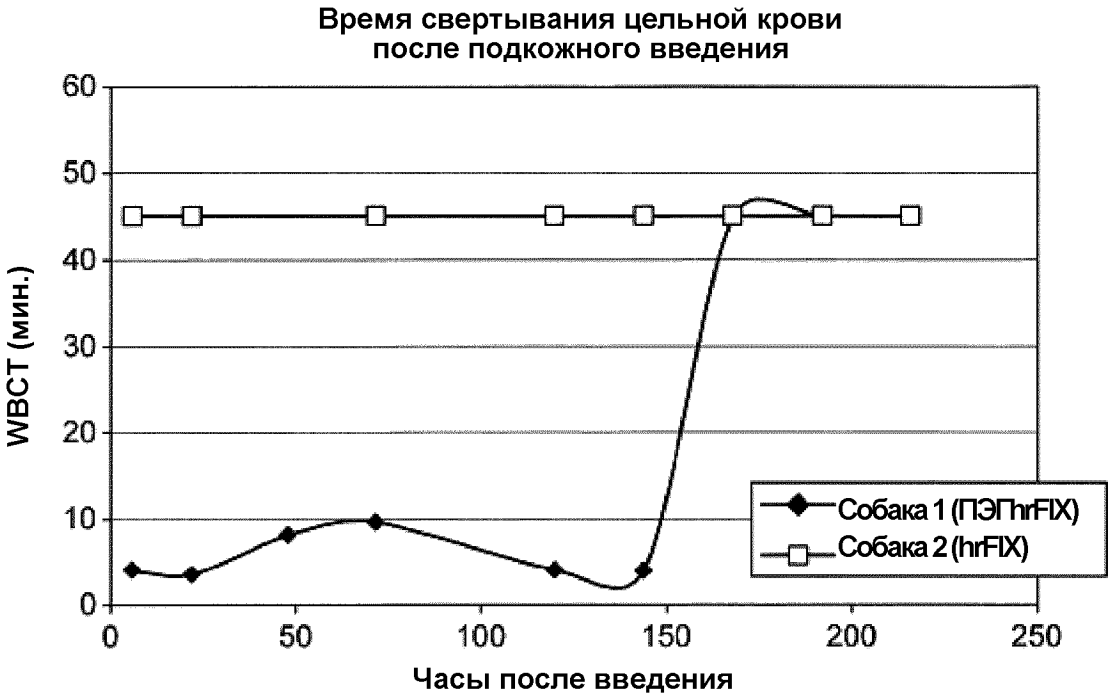
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что вторую лекарственную форму вводят отдельно, одновременно или последовательно относительно первой лекарственной формы.


ВМК, ПК
Внутренний путь
(контактная система)
Внешний путь
(клеточное повреждение)
Тканевой фактор (TF)
FXII
FXIIa
FXI
FXIa
FIX
FIXa
FIX
TF
FVIIa
FVII
FVIII
FVIIIa
TF
FX
FIXa:FVIIIa:Ca2+:ФЛ
Активный протеин С
FX
FXa
FV
FVa
Протеин S
FXa:FVa:Ca2+:ФЛ
Протеин С
+
Тромбомодулин
Протромбин (FII)
Тромбин (FIIa)
Фибриноген
Фибрин
Перекрестносшитый
фибрин, т.е. сгусток
FXIII
FXIIIa

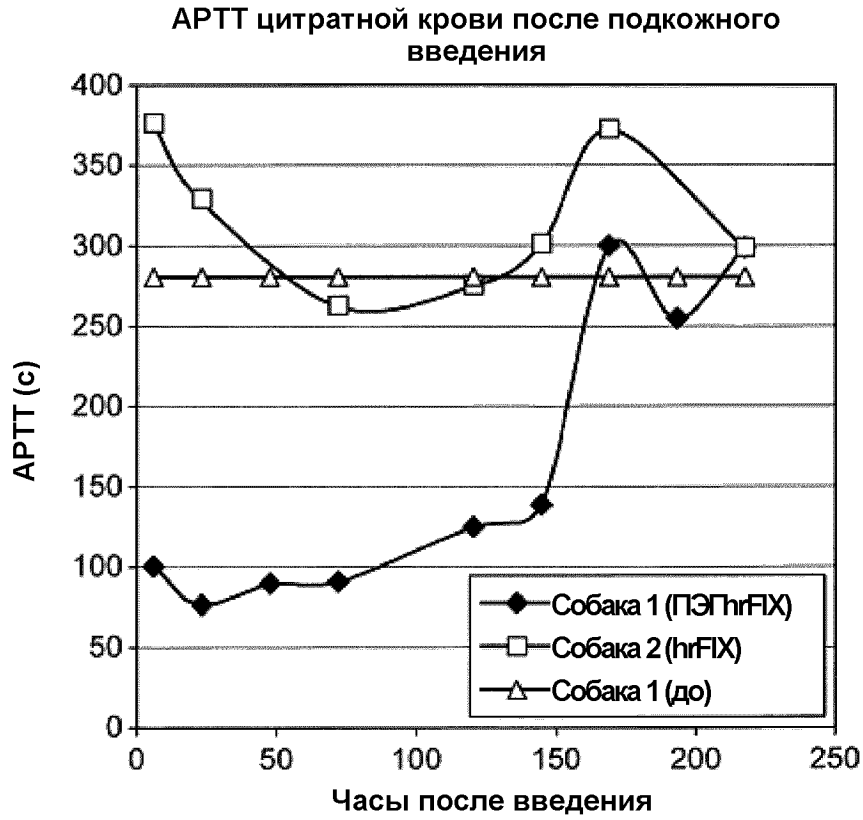
ФИГ. 1


Открытый дисульфид
Присоединение-отщепление
Второе присоединение
Соединённый мостиковой связью дисульфид
R1-PEG
SO2R2

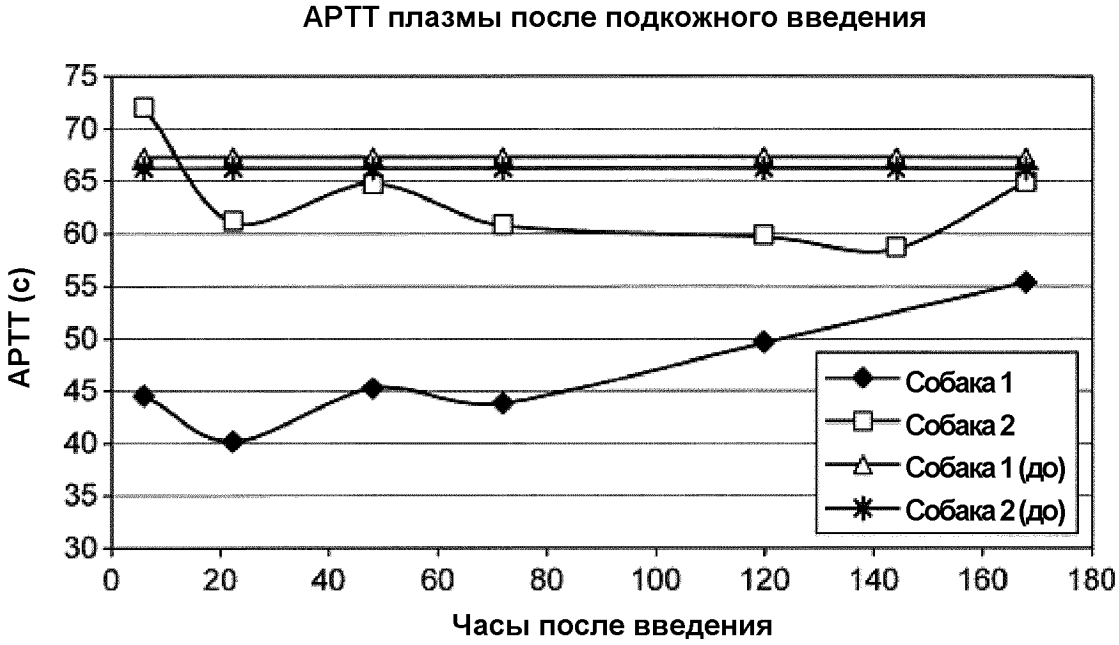
ФИГ. 2


Время свертывания цельной крови
после подкожного введения
WBCT (мин.)
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
Часы после введения
Собака 1 (ПЭГhrFIX)
Собака 2 (hrFIX)

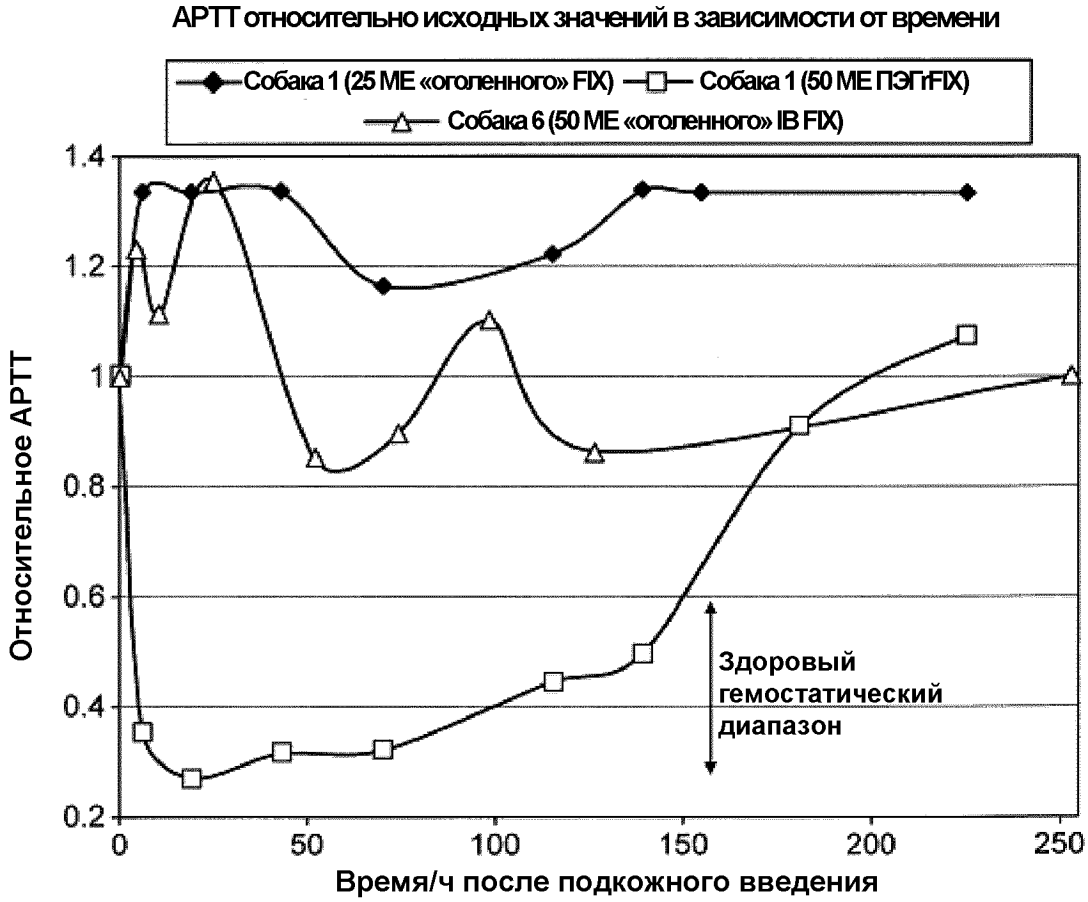
ФИГ. 3


APTT цитратной крови после подкожного
введения
APTT (с)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
Часы после введения
Собака 1 (ПЭГhrFIX)
Собака 2 (hrFIX)
Собака 1 (до)

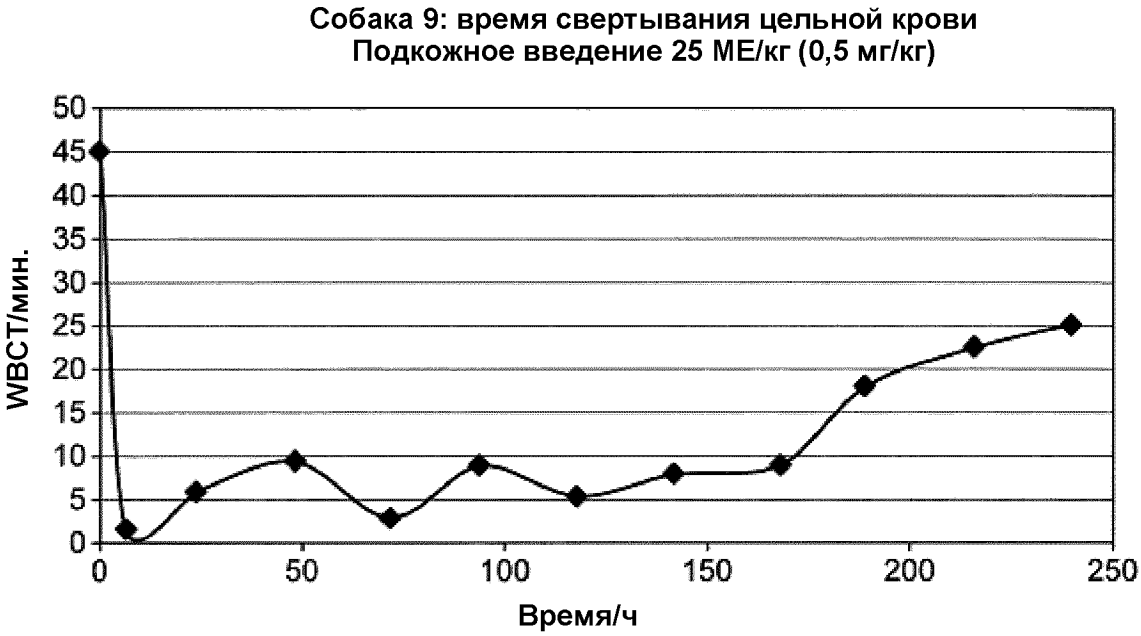
ФИГ. 4


АРТТ плазмы после подкожного введения
АРТТ (с)
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Часы после введения
Собака 1
Собака 2
Собака 1 (до)
Собака 2 (до)

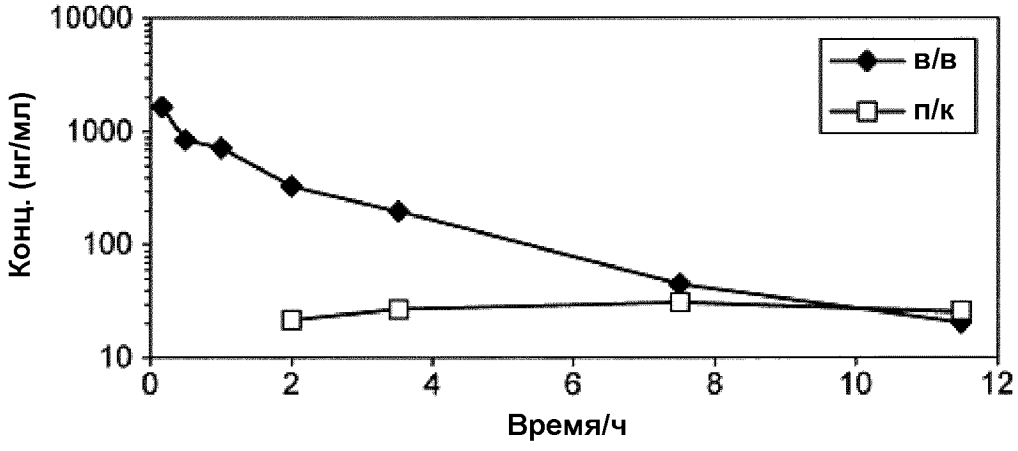
ФИГ. 5


АРТТ относительно исходных значений в зависимости от времени
Собака 1 (25 МЕ «оголенного» FIX)
Собака 1 (50 МЕ ПЭГгFIX)
Собака 6 (50 МЕ «оголенного» IB FIX)
Относительное АРТТ
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
50
100
150
200
250
Время/ч после подкожного введения
Здоровый
гемостатический
диапазон

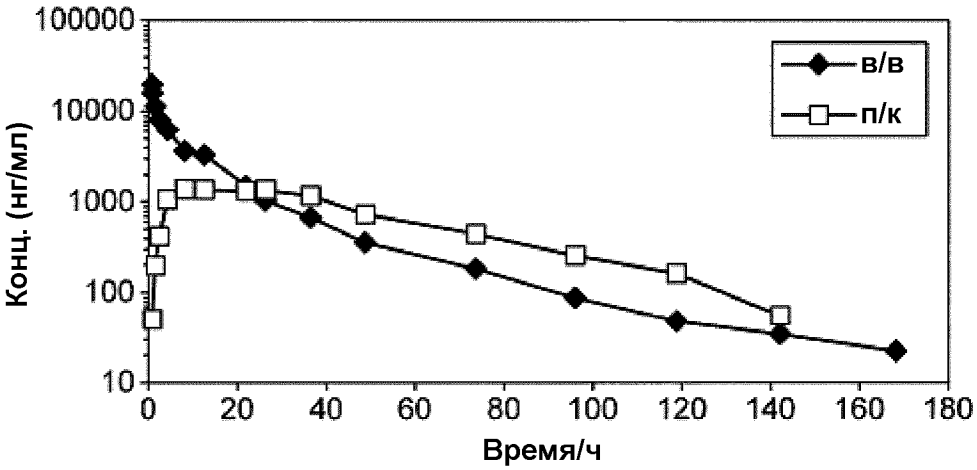
ФИГ. 6


Собака 9: время свертывания цельной крови
Подкожное введение 25 МЕ/кг (0,5 мг/кг)
WBCT/мин.
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
Время/ч

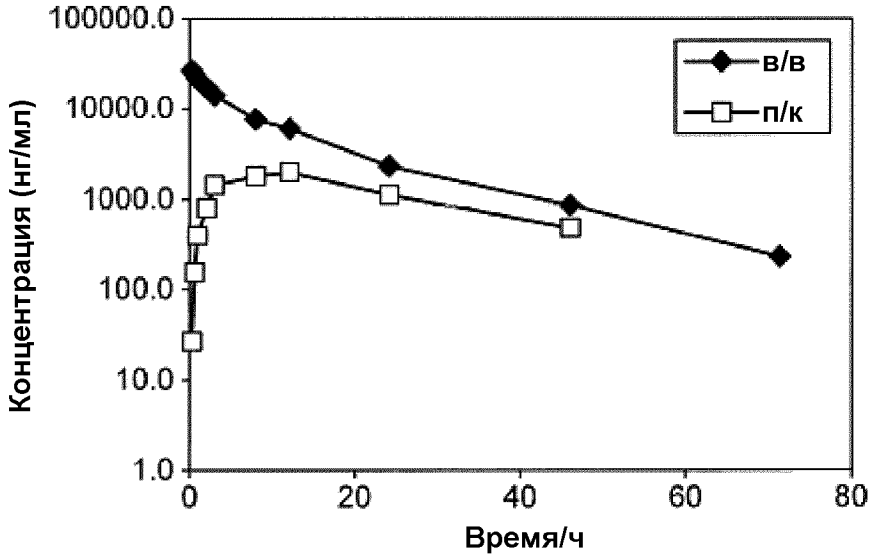
ФИГ. 7


Конц. (нг/мл)
10000
1000
100
10
0
2
4
6
8
10
12
Время/ч
в/в
п/к

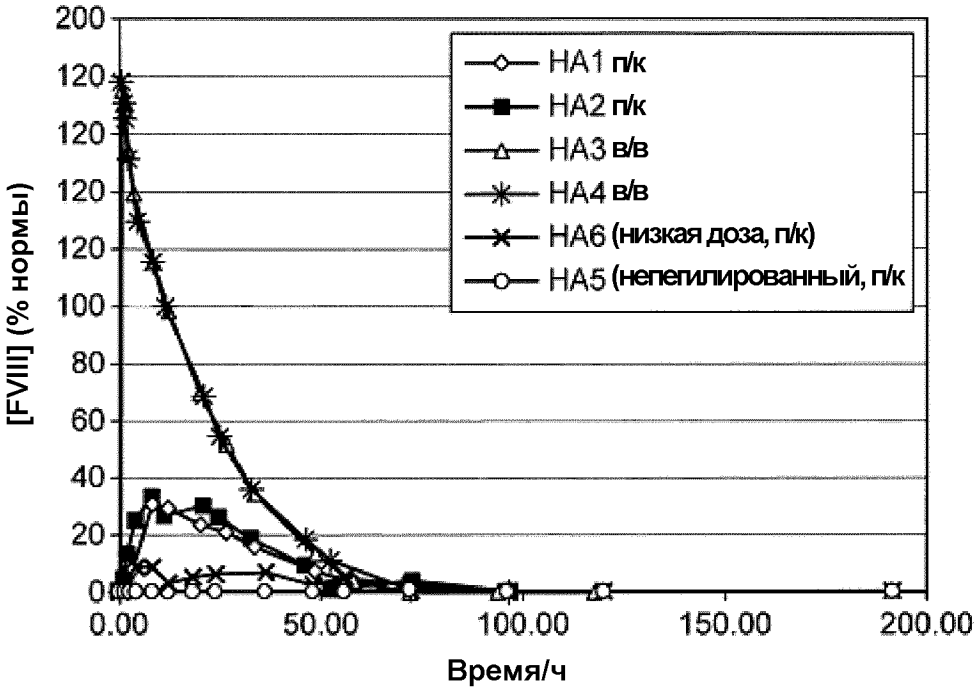
ФИГ. 8


100000
10000
1000
100
10
Конц. (нг/мл)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Время/ч
в/в
п/к

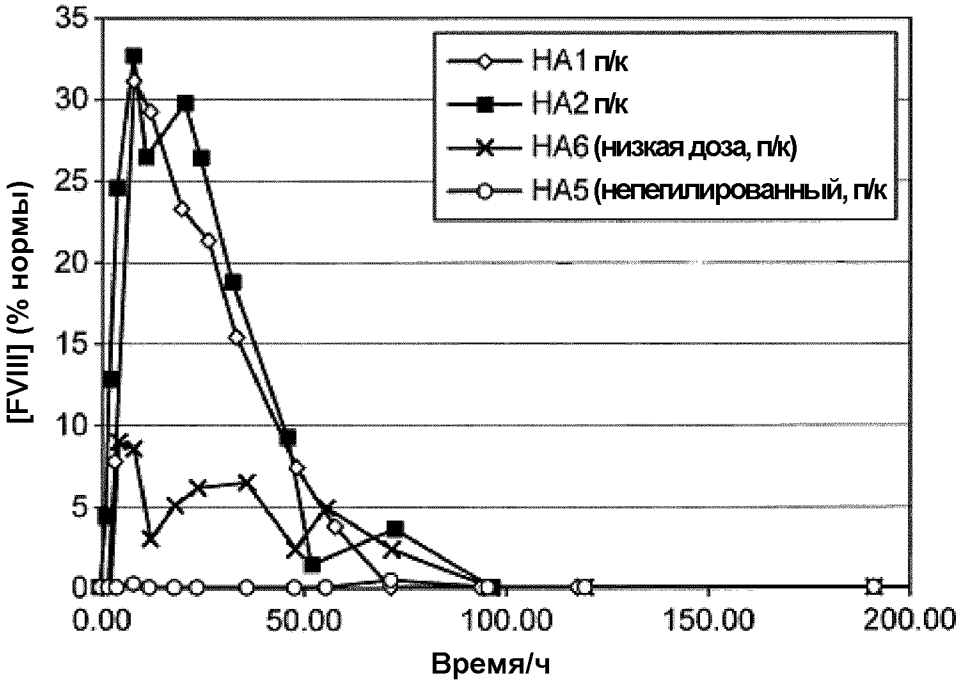
ФИГ. 9


100000.0
10000.0
1000.0
100.0
10.0
1.0
Концентрация (нг/мл)
0
20
40
60
80
Время/ч
в/в
п/к

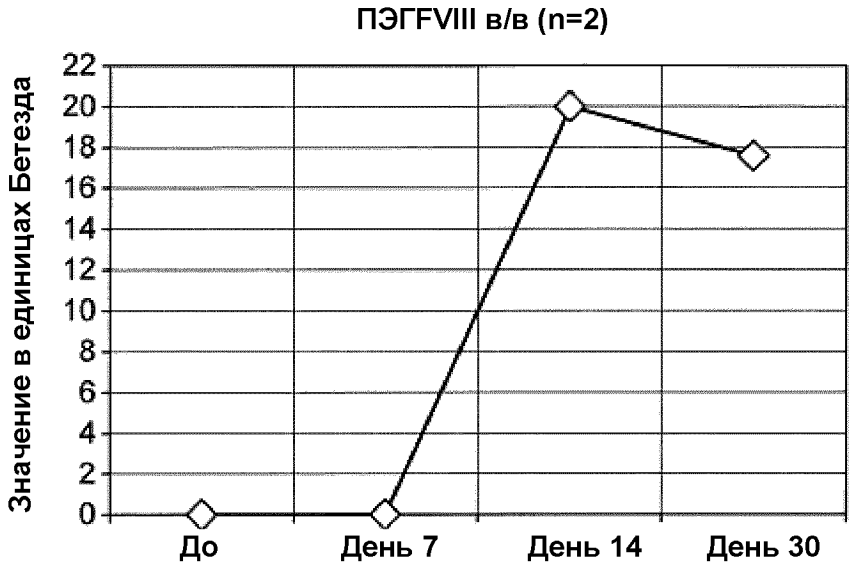
ФИГ. 10


200
120
120
120
120
100
80
60
40
20
0
[FVIII] (% нормы)
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
Время/ч
HA1 п/к
HA2 п/к
HA3 в/в
HA4 в/в
HA6 (низкая доза, п/к)
HA5 (непегилированный, п/к

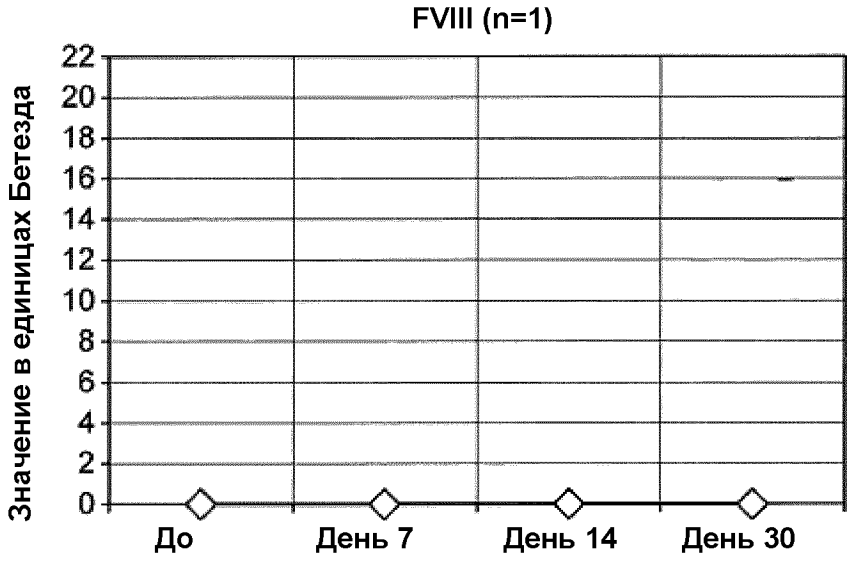
ФИГ. 11


35
30
25
20
15
10
5
0
[FVIII] (% нормы)
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
Время/ч
HA1 п/к
HA2 п/к
HA6 (низкая доза, п/к)
HA5 (непегилированный, п/к

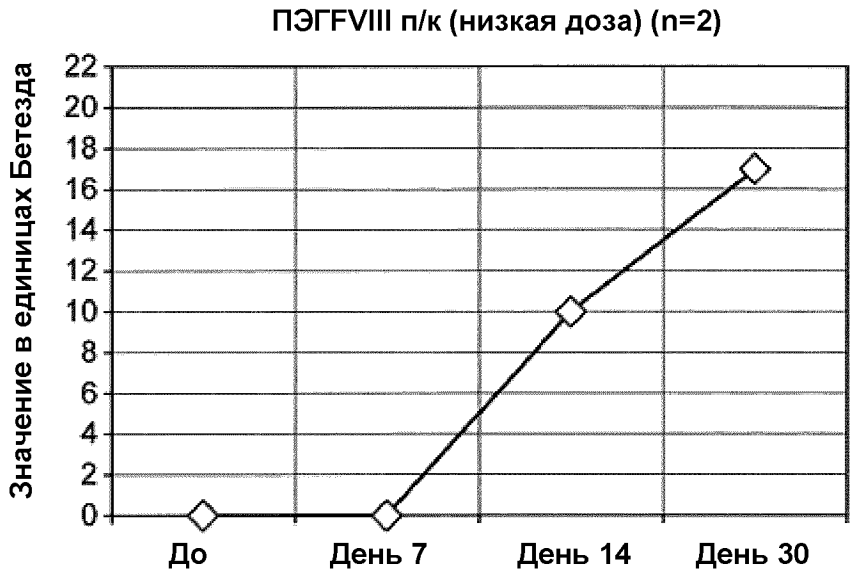
ФИГ. 12



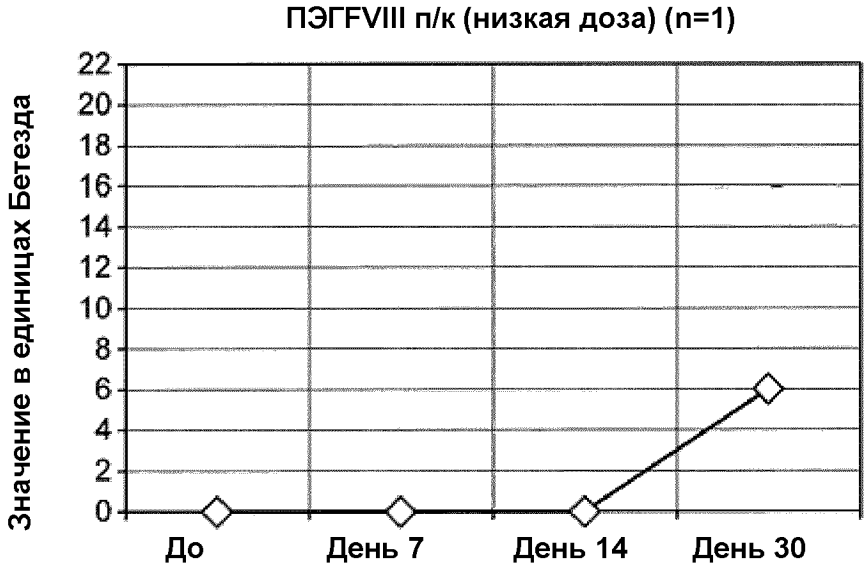
ФИГ. 13a



ФИГ. 13b



ФИГ. 13c



ФИГ. 13d