

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092566 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.30

(22) Дата подачи заявки
2011.07.11

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) ФАКТОР IX ПОЛИПЕПТИДЫ И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 61/363,064; 61/424,555; 61/430,819;
61/438,572; 61/442,079; 61/470,951

(32) 2010.07.09; 2010.12.17; 2011.01.07;
2011.02.01; 2011.02.11; 2011.04.01

(33) US

(62) 201790876; 2011.07.11

(71) Заявитель:
БИОВЕРАТИВ ТЕРАПЬЮТИКС
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Пирс Гленн, Трюкс Саманта, Питерс
Роберт Т., Цзян Хайянь (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет способы введения фактора IX; способы введения химерных и гибридных полипептидов, содержащих фактор IX; химерные и гибридные полипептиды, содержащие фактор IX; полинуклеотиды, кодирующие такие химерные и гибридные полипептиды; клетки, содержащие такие полинуклеотиды; и способы производства таких химерных и гибридных полипептидов с использованием таких клеток.

202092566

A1

A1

202092566

ФАКТОР IX ПОЛИПЕПТИДЫ И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Уровень техники изобретения

Область изобретения

- [01] Настоящее изобретение относится в целом к области терапии гемостатических болезней.

Уровень техники

- [02] Гемофилия В (также известная как болезнь Кристмаса) — одна из наиболее распространенных наследуемых болезней крови в мире. Она приводит к уменьшению *in vivo* и *in vitro* свертываемости крови и требует постоянного медицинского наблюдения в течение жизни больного. Если отсутствуют внешние повреждения, больные подвержены спонтанному кровотечению в суставах, которое приводит к сильной боли и вредному для здоровья отсутствию подвижности; кровотечению в мышцах, приводящему к аккумуляции крови в этих тканях; спонтанному кровотечению в горле и шее, которое может стать причиной асфиксии при отсутствии немедленного лечения; почечному кровотечению; распространены также тяжелые кровотечения после хирургического вмешательства, незначительных случайных повреждений или удаления зубов.
- [03] Нормальная коагуляция крови *in vivo* требует как минимум сериновых протеаз Факторов II (протромбин), VII, IX, X и XI (растворимых белков плазмы); кофакторов, включающих трансмембранный белковый тканевой фактор и плазматические белковые Факторы V и VIII; фибриноген, трансглутаминазу Фактор XIII, фосфолипид (включая активированные тромбоциты) и кальций. Дополнительные белки, включающие калликреин, кининоген высокого молекулярного веса и Фактор XII требуются в некоторых из тестов свертываемости *in vitro*, и могут играть роль *in vivo* при патологических нарушениях.
- [04] При гемофилии свертывание крови нарушается из-за отсутствия определенных плазматических факторов свертывания крови. Причиной гемофилии В является дефицит Фактора IX, что может быть результатом как уменьшения синтеза белка Фактора IX, так и дефективной молекулой со сниженной активностью. Лечение гемофилии производится путем замещения отсутствующего фактора свертывания экзогенными концентратами фактора, высоко обогащенными Фактором IX. Однако производство такого концентрата из крови связано с множеством технических трудностей, как описано ниже.

- [05] При очистке Фактора IX из плазмы (полученный из плазмы Фактор IX; pdFIX) почти исключительно получается активный Фактор IX. Однако такая очистка фактора IX из плазмы очень трудна, поскольку Фактор IX представлен в плазме только в низкой концентрации (5 мкг/мл. Andersson, Thrombosis Research 7: 451 459 (1975). Кроме того, очистка из крови требует удаления или инактивации инфекционных агентов, таких как ВИЧ и вирус гепатита С. Более того, pdFIX имеет короткий период полувыведения и, следовательно, требует частого дозирования. Рекомбинантный фактор IX (rFIX) также доступен, но имеет такой же короткий период полувыведения и требует такого же частого дозирования (например, 2-3 раза в неделю для профилактики), как и pdFIX. rFIX также обладает более низким увеличением концентрации (К значением) по сравнению с pdFIX, что делает необходимым использование более высоких доз rFIX, чем в случае pdFIX.
- [06] Снижение смертности, предотвращение повреждения суставов и улучшенное качество жизни стали важным достижением вследствие разработки полученного из плазмы и рекомбинантного Фактора IX. Пролонгированная защита от кровотечения станет другим значительным прогрессом в лечении пациентов с гемофилией В. Однако на настоящее время не разработано продуктов, которые давали бы пролонгированную защиту. Следовательно, остается потребность в усовершенствованных способах лечения гемофилии, возникшей вследствие недостатка Фактора IX, которые были бы более переносимы и более эффективны, чем существующие терапевтические способы.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [07] Настоящее изобретение предоставляет способы введения Фактора IX с использованием химерных полипептидов, содержащих Фактор IX, и гибридов таких химерных полипептидов; полинуклеотидов, кодирующих такие химерные и гибридные полипептиды; клеток, содержащих такие полинуклеотиды; и способы производства таких химерных и гибридных полипептидов с использованием таких клеток. В некоторых вариантах воплощения Фактор IX химерный полипептид представляет собой Фактор IX FcRn связывающий партнер (BP) химерный полипептид, такой как Фактор IX Fc химерный полипептид. В других вариантах воплощения Фактор IX химерный полипептид представляет собой Фактор IX-XTEN полипептид.
- [08] Настоящее изобретение предоставляет способ введения Фактора IX нуждающемуся в этом пациенту, включая введение пациенту дозы не менее, чем около 10, не

менее, чем около 20, или не менее, чем около 25 МЕ/кг Фактора IX FcRn BP химерного полипептида, например, Фактора IX-Fc химерного полипептида или Фактора IX-XTEN химерного полипептида, с интервалом дозирования примерно один раз в неделю или реже.

- [009] В некоторых вариантах воплощения концентрация в плазме крови химерного полипептида достигает среднего минимального значения не менее, чем около 1 МЕ/дл после не менее, чем около 6 дней у не менее, чем около 70%, не менее, чем около 80%, не менее, чем около 90%, или около 100% популяции пациентов, или достигает у пациента минимального значения не менее, чем около 1, 2, 3, 4 или 5 МЕ/дл после не менее, чем около 6 дней. В некоторых вариантах воплощения уровень в плазме вышеупомянутого химерного полипептида достигает среднего минимального значения около 1-5 или 1-3 МЕ/дл. Такое минимальное или среднее минимальное значение может быть достигнуто после около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39 или около 40 дней.
- [010] В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид имеет сильно редуцированную фосфорилизацию и сульфатацию по сравнению с полученным из плазмы Фактором IX. В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид менее, чем на 25% фосфорилирован и менее, чем на 25% сульфатирован, например, менее, чем на 25% полностью полностью фосфорилирован и сульфатирован. В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид менее, чем на около 10% фосфорилирован и менее, чем на около 9% сульфатирован. В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид имеет паттерн / распределение гамма карбоксилирования, содержание гамма карбоксилирования, паттерн / распределение сиалирования, и / или содержание сиалирования, сходное (то есть в пределах 10%) или равное тому же у Фактора IX Fc химерного полипептида в Примерах 5-6.
- [011] В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид имеет увеличение концентрации более, чем 0,7 или более, чем 0,75 мкг/мл (антиген). В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид имеет среднее увеличение концентрации (К-значение) (активность; наблюдаемое) не менее, чем около 0,8, не менее, чем около 0,9, или не менее, чем около 1 МЕ/дл на МЕ/кг.

- [012] В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид демонстрирует один или более фармакокинетических параметров, у указанной популяции пациентов или у указанного пациента, выбранного из группы, состоящей из:
- [013] (а) средний клиренс (CL) (активность) у указанной популяции пациентов около $3,36 \pm 0,93$ мл/час/кг; средний клиренс (CL) (активность) у указанной популяции пациентов около 3,0-3,72, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, или 3,72 мл/час/кг; средний клиренс (CL) (активность) у указанной популяции пациентов который в около 2,5 раза ниже, чем клиренс полипептида, содержащего указанный Фактор IX без указанного FcRn BP; клиренс (CL) (активность) у указанного пациента около 1,84 - 4,58 мл/час/кг.
- [014] (б) среднее среднее время удержания (MRT) (активность) у указанной популяции пациентов не менее, чем около $68,05 \pm 11,16$ часов; среднее MRT (активность) у указанной популяции пациентов около 60-78, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 или 78 часов; среднее MRT (активность) у указанной популяции пациентов, которое в около 3 раз длиннее, чем среднее MRT полипептида, содержащего указанный Фактор IX без указанного FcRn BP; среднее время удержания (MRT) (активность) у указанного пациента около 53,1 - 85,8 часов; среднее время удержания (MRT) (активность) у указанного пациента не менее, чем около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, или около 90 часов;
- [015] (с) среднее $t_{1/2\beta}$ (активность) у указанной популяции пациентов около $52,5 \pm 9,2$ часов; среднее $t_{1/2\beta}$ (активность) у указанной популяции пациентов, которое составляет около 47 - 60 часов, около 47, около 48, около 49, около 50, около 51, около 52, около 53, около 54, около 55, около 56, около 57, около 58, около 59, около 60 часов; среднее $t_{1/2\beta}$ (активность) у указанной популяции пациентов, которое около 3 раз длиннее, чем среднее $t_{1/2\beta}$ полипептида, содержащего указанный Фактор IX без указанного FcRn BP; $t_{1/2\beta}$ (активность) у указанного пациента около 40 - 67,4, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70 или около 75 часов;
- [016] (d) среднее увеличение концентрации (К значение) (активность; наблюдаемое) у указанной популяции пациентов около $0,93 \pm 0,18$ МЕ/дл на МЕ/кг; среднее увеличение концентрации (К значение) (активность; наблюдаемое) у указанной популяции пациентов около 0,85 - 1,0, около 0,85, около 0,86, около 0,87, около 0,88, около 0,89, около 0,90, около 0,91, около 0,92, около 0,93, около 0,94, около 0,95, около 0,96, около 0,97, около 0,98, около 0,99, около 1,0, около 1,05, около 1,10 или около 1,15 МЕ/дл на МЕ/кг; среднее увеличение концентрации (К

значение) (активность; наблюдаемое) у указанной популяции пациентов, которое на около 24% лучше, чем среднее увеличение концентрации полипептида, содержащего указанный Фактор IX без указанного FcRn BP; увеличение концентрации (К значение) (активность; наблюдаемое) у указанного пациента около 0,62 - 1,17 МЕ/дл на МЕ/кг;

[017] (е) средняя V_{ss} (активность) у указанной популяции пациентов около $226 \pm 67,76$ (скорректированное до 69,8) мл/кг; средняя V_{ss} (активность) у указанной популяции пациентов около 200 - 300, около 200, около 210, около 220, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 280, около 290 или около 300 мл/кг; V_{ss} (активность) у указанного пациента около 145 - 365 мл/кг;

[018] (f) средняя AUC/доза (активность) у указанной популяции пациентов около $32,44 \pm 10,75$ МЕ*ч/дл на МЕ/кг; средняя AUC/доза (активность) у указанной популяции пациентов около 26 - 40, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39 или около 40 МЕ*ч/дл на МЕ/кг; AUC/доза у указанного пациента около 21,80 – 54,30 МЕ*ч/дл на МЕ/кг.

[019] В некоторых вариантах воплощения доза химерного полипептида содержит значительно более низкую (в 10-100 раз) концентрацию (0,01-0,001%) активированного FIX (FIXa), чем в производимых в настоящее время продуктах Фактора IX, таких как MONONINE™ (pdFIX; CSL Behring)) или BENEFIX™ (Wyeth; rFIX) (0,1%). Такая концентрация может быть в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз ниже, чем производимых в настоящее время продуктов, или 0,01, 0,05, 0,0033, 0,0025, 0,002, 0,00167, 0,00142, 0,00125, 0,00111 или 0,001%.

[020] В некоторых вариантах воплощения интервал дозирования составляет 6 - 18, 6 - 10, 9 - 18, не менее, чем 6, не менее, чем 7, не менее, чем 8, не менее, чем 9, не менее, чем 10, не менее, чем 11, не менее, чем 12, не менее, чем 13, не менее, чем 14, не менее, чем 15, не менее, чем 16, не менее, чем 17, или не менее, чем 18 дней, еженедельно, два раза в месяц, или один раз в месяц. Интервал дозирования может быть профилактическим интервалом дозирования, фиксированным профилактическим интервалом дозирования или индивидуализированным профилактическим интервалом дозирования.

[021] Способы изобретения применяются к пациенту, нуждающемуся в контроле или предотвращении кровотечения или эпизодов кровотечения, нуждающемуся в интермиттирующей терапии, нуждающемуся в профилактическом лечении или нуждающемуся в лечении при необходимости.

- [022] Терапевтические дозы, которые могут быть использованы в способах изобретения, составляют около 25-180, около 20-180, около 20-50, около 20-100, около 10-180, около 10-50, около 10-30 или около 50-100 МЕ/кг. Доза может быть фиксированной дозой или индивидуализированной дозой.
- [023] В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид вводится внутривенно или подкожно.
- [024] Пациентом в способах изобретения может быть человек или не являющееся человеком млекопитающее. Не являющиеся людьми млекопитающие включают мышей, собак, приматов, обезьян, кошек, лошадей, коров, свиней и других домашних животных и маленьких животных.
- [025] Химерный полипептид может быть в форме гибрида, содержащего второй полипептид в соединении с указанным химерным полипептидом, при этом указанный второй полипептид содержит или состоит преимущественно из FcRn BP, например, Fc. Химерный полипептид может быть не менее, чем на 90%, не менее, чем на 95% или 100% идентичен последовательности Фактора IX, последовательности Fc или как последовательности Фактора IX, так и последовательности Fc в Таблицах 2A (SEQ ID NO:2) и/или 2B (SEQ ID NO:4), с или без сигнальной последовательностью (ями) и полипептидом.
- [026] Химерный полипептид или гибрид может вводиться как часть фармацевтического состава, содержащего не менее чем одно вспомогательное вещество.
- [027] Изобретение также предоставляет сами вышеописанные химерные и гибридные полипептиды, полинуклеотиды, их кодирующие, культивируемые человеческие эмбриональные клетки, содержащие полинуклеотиды, и способы производства таких химерных и гибридных полипептидов, и полипептиды, производимые такими способами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ/ФИГУР

- [028] ФИГ. 1. Схема одного типа Фактора IX химерного полипептида, Фактора IX-Fc гибрида.
- [029] ФИГ. 2. Групповая средняя концентрация FIXFc по сравнению с временными профилями; сравнение номинальной дозы.
- [030] ФИГ. 3. Групповая средняя активность FIXFc по сравнению с временными профилями; сравнение номинальной дозы.
- [031] ФИГ. 4. Дерево решений вычитания базового уровня.
- [032] ФИГ. 5. Дозопропорциональное возрастание C_{max} и AUC для FIX активности.

- [033] ФИГ. 6. Оцененная терапевтическая продолжительность rFIXFc при 50 (А) и 100 (В) МЕ/кг.
- [034] ФИГ. 7. Дозопропорциональное возрастание S_{max} и AUC для FIX антигена.
- [035] ФИГ. 8. Фармакокинетические оценки для rFIXFc антигена при 50 (А) и 100 (В) МЕ/кг номинальных дозах.
- [036] ФИГ. 9. Точная корреляция между rFIXFc активностью и уровнями антигена. Следует заметить, что вследствие перерасчета РК активности, как обсуждается в Примере 11, $R^2 = 0,946$.
- [037] ФИГ. 10. rFIX-Fc доменная структура и посттрансляционные модификации. PRO: Пропептид, расщепленный процессирующим ферментом. GLA: содержит 12 γ -карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla). АСТ PEP: активационный пептид расщепляется для получения активной протеазы. Другие модификации: N- и O- гликозилирование, Asp(64) β -гидроксилирование, Tyr сульфатация, Ser фосфорилирование.
- [038] ФИГ. 11. SDS-PAGE гель очистки промежуточных продуктов и очищенного FIXFc мономера. Пробы с различных этапов очистки FIXFc анализировались с помощью невозстановительного SDS-PAGE. Дорожка 1: Маркеры SeeBlue плюс молекулярного веса (Invitrogen). Дорожка 2: пустая дорожка. Дорожка 3: Белок А загружен. Дорожка 4: Белок А элюат. Дорожка 5: Фрактогель DEAE элюат. Дорожка 6: Q Seph FF элюат. Дорожка 7: конечный объем FIXFc. Дорожка 8: пустая дорожка. Дорожка 9: конечный объем редуцированного FIXFc.
- [039] ФИГ. 12. Функциональная активность FIXFc у дефицитных по FIX мышей. Дефицитным по FIX мышам была введена внутривенно доза 219 МЕ/кг FIXFc (3 или 4 на группу, 6 групп, $n = 23$) или 200 МЕ/кг rFIX (3 или 4 на группу, 5 групп, $n = 23$) на времени = 0. Пробы крови были собраны в различное время после дозирования (от 0,25 ч до 96 ч) и проанализированы на активность свертывания с использованием анализа FIX активности. * rFIX активность не определялась у всех мышей на временных точках после 48 ч после дозирования.
- [040] ФИГ. 13. Время свертывания цельной крови FIXFc по сравнению с рекомбинантным FIX у дефицитных по FIX мышей. Дефицитные по FIX мыши (6 на группу) получили внутривенно дозу 50 МЕ/кг FIXFc или 50 МЕ/кг rFIX. Пробы крови были собраны перед дозированием и на различных временах после дозирования. Пробы крови инкубировались при 37°C и визуально проверялись на присутствие сгустков крови один раз в минуту. Время, необходимое для формирования сгустков крови, отмечалось, и когда активность свертывания

возвращалась к базовому уровню (то есть сгустки не формировались), дополнительные пробы не получали (пробы собирались от 15 мин до 144 ч для FIXFc или от 15 мин до 72 ч для rFIX).

[041] ФИГ. 14. Фармакодинамика FIXFc у дефицитных по FIX мышей. Дефицитным по FIX мышам была введена доза 219 МЕ/кг FIXFc (5 на группу, 6 групп, $n = 30$) или 200 МЕ/кг rFIX (4 или 5 на группу, 6 групп, $n = 28$) на День 0, 4 и 8. Пробы плазмы крови были собраны путем пункции сердца на 15 мин и 96 ч после каждой дозы и активность свертывания измерялась с использованием анализа FIX активности. Плазма была также собрана из крови хвоста на 8, 24, 48 и 72 ч после каждой дозы. Уровни FIXFc были подсчитаны во всех пробах с использованием ELISA, специфичного на FIXFc. (А) Измеренная v . Рассчитанная активность. Активность свертывания для FIXFc рассчитывалась с использованием анализа FIX активности на 15 мин и 96 ч после трех доз. Было определено, что активность свертывания *in vitro* для FIXFc составляла $43,8 \pm 5,4$ МЕ/мг. Основываясь на этой активности (МЕ/мг) и измеренных уровнях белка, рассчитанный уровень активности свертывания был определен на временных точках 15 мин, 8, 24, 48, 72 и 96 ч после каждой дозы. (В) У дефицитных по FIX мышей, обработанных тремя дозами 200 МЕ/кг rFIX, уровни FIX были рассчитаны с использованием FIX-специфичного ELISA. С использованием измеренных специфичных активностей FIXFc и rFIX, стало возможно сравнить рассчитанную активность свертывания для всех проб, анализированных с помощью ELISA.

[042] ФИГ. 15. Фармакокинетика и фармакодинамика FIXFc у дефицитных по FIX собаках. Двум собакам с гемофилией В внутривенно влили 140 МЕ/кг FIXFc. Пробы крови были собраны на 5, 15 и 30 мин, и на 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 27, 30, 48, 51, 54, 72, 80, 96, 126, 144 и 168 ч. (А) Метод сэндвича ELISA с использованием FIX иммобилизованного антитела и Fc-HRP идентифицирующего антитела был использован для измерения концентрации интактного FIXFc в пробах крови собак с гемофилией В. (В) FIX активность свертывания измерялась на всех временных точках по отношению к стандартной кривой, сделанной с FIXFc. (С) Кровь, собранная у животных, немедленно анализировалась на время свертывания цельной крови. Пробы крови инкубировались при 28°C и визуально проверялись на присутствие сгустков крови один раз в минуту, и отмечалось время, за которое формировался сгусток.

[043] ФИГ. 16. Фармакокинетика FIXFc у яванских макаков. Макакам была введена однократная доза (0,5, 2 и 10 мг/кг, соответствующая приблизительно 25, 100 или

500 МЕ/кг) FIXFc (n = 2, 3 и 3, соответственно). Пробы крови были собраны на 0,25, 0,5, 1, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч после дозы и плазма была подготовлена для анализа концентрации белка с помощью FIXFc-специфичного ELISA.

- [044] ФИГ. 17. rFIXFc и BENEFIX™ показывают сравнимую активность и дозозависимую реакцию в цельной крови из HemB мышей. (A) ROTEM® Параметры. rFIX или BENEFIX™ были впрыснуты в кровь HemB мышей и параметры свертывания измерялись по ROTEM®. (B)-(D) Дозозависимый ответ, измерение (B) CT, (C) CFT и (D) Альфа-угол.
- [045] ФИГ. 18. Определение эффективности в неотложных случаях в модели отсечения хвоста у мышей с гемофилией.
- [046] ФИГ. 19. (A) Потеря крови после отрезания хвоста у отдельных HemB мышей, обработанных rFIXFc или BENEFIX™. (B) Дозозависимая реакция на rFIXFc и BENEFIX™ по медианной потере крови после отрезания хвоста у HemB мышей.
- [047] ФИГ. 20. Модель кровотока при рассечении хвостовой вены (TVT) у HemB мышей: модель для характеристики венозного кровотока у пациентов с тяжелой гемофилией.
- [048] ФИГ. 21. Пролонгированная активность rFIXFc по сравнению с BENEFIX™ в опытных HemB мышцах по цельной крови ROTEM®. (A) CT, (B) CFT, (C) Альфа-угол, и (D) частичная корреляция между активностью свертывания цельной крови (CT) по ROTEM® по сравнению с плазменной активностью по aPTT.
- [049] ФИГ. 22. Пролонгированная эффективность FIXFc по сравнению с BENEFIX™ в модели кровотока при рассечении хвостовой вены (TVT) у HemB мышей. (A) Выживаемость: Степени выживаемости сравнивались у мышей, получавших BENEFIX™ за 24 часа перед TVT, и у мышей, получавших rFIXFc за 72 часа перед TVT, и (B) Остановка кровотока: Степени кровотока сравнивались у мышей, получавших BENEFIX™ за 24 часа перед TVT, и у мышей, получавших rFIXFc за 72 часа перед TVT.
- [050] ФИГ. 23. Корреляция между повышением концентрации активного rFIXFc по отношению к весу тела у 12 пациентов, которые получали однократную дозу 12,5 - 100 МЕ/кг rFIXFc.
- [051] ФИГ. 24. Моделирование по методу Монте-Карло с использованием структурной PK модели rFIXFc активности для создания профилей активность-время для достижения минимального уровня 1 МЕ/дл выше базового уровня после еженедельного (A), каждые 10 дней (B) или каждые две недели режима

дозирования (С). Медианные РК параметры популяции и релевантные вариации между пациентами и у одного пациента были взяты из Фазы 1/2а клинического исследования. 1000 пациентов вошли в моделирование на дозовый режим с 14-16 точками взятия проб для каждого пациента, и среднее $\pm$ SD профилей активность-время 1000 пациентов было сконструировано графически для различных дозовых режимов.

- [052] ФИГ. 25. Моделирование по методу Монте-Карло для rFIXFc доз для достижения минимального уровня 1 МЕ/дл (1%), основанное на пересчитанных фармакокинетических данных. (А) один раз в неделю, (В) каждые 10 дней, и (С) каждые две недели.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [053] Настоящее изобретение предоставляет способ лечения недостатка Фактора IX, например, гемофилии В, Фактором IX, с использованием более длинного интервала дозирования и / или улучшенных фармакокинетических параметров, чем это возможно с известными в настоящее время продуктами с Фактором IX. Настоящее изобретение также предоставляет улучшенные Фактор IX химерные полипептиды, Фактор IX химерные полинуклеотиды и способы производства.
- [054] "Введение" при использовании здесь, означает дать фармацевтически приемлемый Фактор IX полипептид изобретения пациенту фармацевтически приемлемым способом. Предпочитаемые способы введения являются внутривенными, например, внутривенная инъекция и внутривенное вливание, например, посредством центрального венозного доступа. Дополнительные способы введения включают подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и пульмонарное введение, предпочтительно подкожное. Фактор IX химерные полипептиды и гибридные белки могут быть введены как часть фармацевтического состава, содержащего не менее, чем одно вспомогательное вещество. Преимущества настоящего изобретения включают: улучшенное соблюдение режима; снижение повреждений из-за кровотечения; повышенную защиту суставов от кровотечений; профилактику повреждения суставов; сниженную болезненность; сниженную смертность; пролонгированную защиту от кровотечения; снижение тромботических случаев; и улучшенное качество жизни.
- [055] "Химерный полипептид" при использовании здесь, означает полипептид, который включает в себя не менее чем два полипептида (или их части, такие как субпоследовательности или пептиды) из различных источников. Химерные

полипептиды могут включать два, три, четыре, пять, шесть, семь или более полипептидов или их частей из различных источников, таких как различные гены, различные кДНК или различные животные или другие виды. Химерные полипептиды могут включать один или более линкеров, связывающих различные полипептиды или их части. Таким образом, полипептиды или их части могут быть соединены прямо или они могут быть соединены непрямо, посредством линкеров, или обоими способами, с одним химерным полипептидом. Химерные полипептиды могут включать дополнительные пептиды, такие как сигнальные последовательности и такие последовательности как 6His и FLAG, что способствует очистке или детекции белка. Кроме того, химерные полипептиды могут иметь аминокислотные или пептидные добавки на N- и/или C-конце. Примерами химерных полипептидов изобретения являются Фактор IX-FcRn BP химерные полипептиды, например, Фактор IX-Fc химерные полипептиды, такие как FIXFc на Фигуре 1, SEQ ID NO:2 (Таблица 2) и Примеров 1-4, с или без своей сигнальной последовательности и пропептида. Другие примеры химерных полипептидов изобретения включают, не ограничиваясь тем самым, Фактор IX-XTEN химерные полипептиды. Фактор IX может быть гибридизирован или с N-концом, или с C-концом XTEN.

- [056] Химерный полипептид может содержать последовательность, не менее чем на 90% или не менее чем на 95% или 100% идентичную Фактору IX и FcRn BP, например, Fc аминокислотную последовательность, показанную в Таблице 2A без сигнальной последовательности и пропептидной последовательности (аминокислоты с 1 по 642 из SEQ ID NO:2), или альтернативно, с пропептидной последовательностью, или альтернативно с сигнальной последовательностью и пропептидной последовательностью.
- [057] "Культура", "культивировать" и "культивирование" при использовании здесь, означает инкубировать клетки в условиях *in vitro*, которые дают клеткам возможность расти или делиться или поддерживают клетки в живом состоянии. "Культивируемые клетки" при использовании здесь означает клетки, которые размножаются *in vitro*.
- [058] "Фактор IX" и "FIX" при использовании здесь означает функциональный Фактор IX полипептид в своей нормальной роли в коагуляции, если не указано иное. Таким образом, термин Фактор IX включает различные полипептиды, которые являются функциональными, и полинуклеотиды, которые кодируют такие функциональные варианты полипептидов. Предпочитаемые Фактор IX полипептиды представляют

собой человеческие, бычьи, свиные, собачьи, кошачьи и мышьиные Фактор IX полипептиды. Известны полной длины полипептид и полинуклеотидные последовательности Фактора IX, а также многие функциональные варианты, например, фрагменты, мутанты и модифицированные версии. Фактор IX полипептиды включают полной длины Фактор IX, полной длины Фактор IX без Met на N-конце, полной длины Фактор IX без сигнальной последовательности, зрелый Фактор IX (без сигнальной последовательности и пропептида), и зрелый Фактор IX с добавочным Met на N-конце. Фактор IX предпочтительно производится рекомбинантными методами ("рекомбинантный Фактор IX" или "rFIX"), то есть он не является природным или полученным из плазмы крови.

[059] Известно очень много функциональных вариантов Фактора IX. Международная публикация номер WO 02/040544 A3, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает мутанты, которые демонстрируют повышенную устойчивость к ингибированию гепарином, на странице 4, строки 9-30, и на странице 15, строки 6-31. Международная публикация номер WO 03/020764 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает мутанты Фактора IX с редуцированной иммуногенностью Т-клеток в Таблицах 2 и 3 (на страницах 14-24), и на странице 12, строки 1-27. Международная публикация номер WO 2007/149406 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает функциональный мутант Фактора IX молекул, который демонстрирует повышенную белковую стабильность, повышенный период полувыведения *in vivo* и *in vitro* и повышенную устойчивость к протеазам от страницы 4, строка 1 до страницы 19, строка 11. WO 2007/149406 A2 также раскрывает химерный и другой вариант Фактора IX молекул от страницы 19, строка 12 до страницы 20, строка 9. Международная публикация номер WO 08/118507 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает мутанты Фактора IX, которые демонстрируют повышенную активность свертывания крови, от страницы 5, строка 14 до страницы 6, строка 5. Международная публикация номер WO 09/051717 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает мутанты Фактора IX, имеющие повышенное число N-связанных и/или O-связанных сайтов гликозилирования, которое приводит к возросшему периоду полувыведения и/или удержания от страницы 9, строка 11 до страницы 20, строка 2. Международная публикация номер WO 09/137254 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, также

раскрывает мутанты Фактора IX с повышенным числом сайтов гликозилирования от страницы 2, параграф [006] до страницы 5, параграф [011] и от страницы 16, параграф [044] до страницы 24, параграф [057]. Международная публикация номер WO 09/130198 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает функциональный мутант Фактора IX молекул, который имеет повышенное число сайтов гликозилирования, что приводит к возрастанию периода полувыведения, от страницы 4, строка 26, до страницы 12, строка 6. Международная публикация номер WO 09/140015 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, раскрывает функциональные Фактор IX мутанты, которые имеют повышенное количество Cys остатков, что может быть использовано для полимерной (например, PEG) конъюгации, от страницы 11, параграф [0043] до страницы 13, параграф [0053].

- [060] Кроме того, сотни нефункциональных мутаций по Фактору IX идентифицированы у пациентов с гемофилией, многие из которых раскрыты в Таблице 1, на страницах 11-14 Международной публикации номер WO 09/137254 A2, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Такие нефункциональные мутации не включены в изобретение, но предоставляют дополнительное руководство к тому, какие мутации с большей или меньшей вероятностью приведут к получению функционального Фактор IX полипептида.
- [061] Фактор IX (или Фактор IX часть химерного полипептида) может быть не менее, чем на 90% или не менее, чем на 95% или не менее, чем на 100% идентичен Фактора IX аминокислотной последовательности, показанной в Таблице 2А без сигнальной последовательности и пропептидной последовательности (аминокислоты с 1 по 415 из SEQ ID NO:2), или альтернативно, с пропептидной последовательностью, или с пропептидной и сигнальной последовательностью (полной длины Фактор IX).
- [062] Фактора IX коагуляционная активность выражается в Международных Единицах (МЕ). Одна МЕ активности Фактора IX соответствует приблизительно количеству Фактора IX в одном миллилитре нормальной плазмы крови человека. Несколько исследований подходят для измерения активности Фактора IX, включая одностадийное исследование свертываемости крови (активированное частичное тромбопластиновое время; аРТТ), время образования тромбина (TGA) и ротационная тромбоэластография (ROTEM®). См., например, Пример 3.
- [063] "FcRn связывающий партнер" или "FcRn BP" при использовании здесь, означает связывающие партнеры функционального неонатального Fc рецептора (FcRn), если

не указано другое. FcRn связывающий партнер является любой молекулой, которая может специфично связываться с FcRn рецептором с последующим активным транспортом FcRn рецептором FcRn связывающего партнера. Таким образом, термин FcRn BP включает любые варианты IgG Fc, которые являются функциональными. Например, область Fc части IgG, которая связывается с FcRn рецептором, описана на основе рентгеноструктурной кристаллографии (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379, включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки). Главный контактный участок Fc с FcRn находится рядом с соединением CH2 и CH3 доменов. Fc-FcRn контакты все находятся внутри одной Ig тяжелой цепи. FcRn BPs включает целый IgG, Fc фрагмент IgG, и другие фрагменты IgG, которые включают полный связывающий регион FcRn. Главные контактные сайты включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 CH2 домена и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 CH3 домена. Все упоминания аминокислотной нумерации иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулинов, или участков, основаны на Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. (FcRn рецептор выделен из нескольких видов млекопитающих, включая человека. Известны последовательности человеческих FcRn, крысиных FcRn и мышиных FcRn (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180: 2377), включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.) FcRn BP может содержать CH2 и CH3 домены иммуноглобулинов, имеющие или не имеющие петлевые участки иммуноглобулина. Приведенные в качестве примера FcRn BP варианты предоставлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, которые включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.

- [064]** FcRn BP также включает альбумин и его фрагменты, которые связываются с FcRn. Предпочтительно альбумин представляет собой альбумин человека. Фактор IX может быть соединен или с N-концом альбумина или с C-концом альбумина, при условии, что Фактора IX компонент Фактор IX-альбумин гибридного белка может процессироваться ферментативно активной пропротеинконвертазой для получения процессированного Фактор IX-содержащего полипептида. Примеры альбумина, например, его фрагменты, которые можно использовать в настоящем изобретении, известны, например, Патент США No. 7,592,010; Патент США No. 6,686,179; и Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009), каждый из которых включен в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.

- [065] FcRn BP (или участок FcRn BP в химерном полипептиде) может содержать одну или более мутаций, и комбинаций мутаций.
- [066] FcRn BP ((или участок FcRn BP в химерном полипептиде) может содержать мутации, дающие увеличенный период полураспада, такие как M252Y, S254T, T256E и их комбинации, как раскрыто у Oganessian et al., Mol. Immunol. 46:1750 (2009), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки; H433K, N434F и их комбинации, как раскрыто у Vaccaro et al., Nat. Biotechnol. 23:1283 (2005), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки; мутанты раскрыты на страницах 1-2, параграф [0012], и в Примерах 9 и 10 США 2009/0264627 A1, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки; и мутанты раскрыты на странице 2, параграфы с [0014] по [0021] из США 20090163699 A1, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.
- [067] FcRn BP (или участок FcRn BP в химерном полипептиде) также может включать следующие мутации: Fc регион IgG может быть модифицирован в соответствии с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и тому подобными для получения модифицированных IgG или Fc фрагментов или их частей, которые будут связываться с FcRn. Такие модификации включают модификации, далекие от контактирующих с FcRn сайтов, а также модификации внутри контактирующих сайтов, которые сохраняют или даже усиливают связывание с FcRn. Например, следующие одиночные аминокислотные остатки в человеческом IgG1 Fc (Fcγ1) могут быть замещены без значительной потери Fc связывающей аффинности к FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где например P238A представляет дикий тип пролина, замещенный аланином в позиции номер 238. В добавление к аланину, другие аминокислоты могут быть замещены диким типом

аминокислот в позициях, обозначенных выше. Мутации могут быть внедрены однократно в Fc, давая начало более, чем одной сотне FcRn связывающих партнеров, отличающихся от нативного Fc. Кроме того, комбинации двух, трех или более из этих индивидуальных мутаций могут быть введены вместе, давая начало еще сотням FcRn связывающих партнеров. Некоторые из этих мутаций могут давать новую функциональность относительно FcRn связывающего партнера. Например, один вариант воплощения включает N297A, удаляя высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Действие этой мутации уменьшает иммуногенность, тем самым усиливая циркулирующий полупериод FcRn связывающего партнера, и возмещая неспособность FcRn связывающего партнера связываться с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIA, без мешающей аффинности к FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки). Кроме того, не менее, чем три человеческих Fc гамма рецептора, по-видимому, распознают сайт связывания IgG внутри нижнего петлевого участка, обычно аминокислоты 234-237. Следовательно, другой пример новой функциональности и потенциально сниженной иммуногенности может стать результатом мутаций в этом участке, как, например, путем замещения аминокислот 233-236 человеческого IgG1 "ELLG" на соответствующую последовательность из IgG2 "PVA" (с одной аминокислотной делецией). Показано, что FcγRI, FcγRII и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1, если интродуцированы такие мутации. (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки; и Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки). Как дальнейший пример новой функциональности, возникающей вследствие мутаций, описанных выше, аффинность к FcRn может быть повышена более, чем у дикого типа в некоторых случаях. Эта повышенная аффинность может отражать повышенную степень «включения», сниженную степень «выключения» или как повышенную степень «включения», так и пониженную степень «выключения». Считается, что мутации придают повышенную аффинность FcRn, включая T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et

al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки).

- [068] The FcRn BP (или участок FcRn BP в химерном полипептиде) может быть не менее, чем на 90% или не менее, чем на 95% или на 100% идентичен Fc аминокислотной последовательности, показанной в Таблице 2А или В без сигнальной последовательности (аминокислоты от 1 до 227 из SEQ ID NO:2), или альтернативно, с сигнальной последовательностью.
- [069] "Гибридные" полипептиды и белки, при использовании здесь, означает комбинацию химерного полипептида со вторым полипептидом. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством нековалентных взаимодействий белок-белок, таких как цепь-цепь или гидрофобные взаимодействия. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом через ковалентную связь(и), такие как дисульфидные связи. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством более, чем одного типа связи, таких как нековалентные и дисульфидные связи. Гибриды описаны в WO 2004/101740, WO2005/001025, US Pat. No. 7,404,956, US Pat. No. 7,348,004 и WO 2006/074199, каждая из которых включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Второй полипептид может быть второй копией того же химерного полипептида или может быть неидентичным химерным полипептидом. В предпочитаемых вариантах воплощения второй полипептид представляет собой полипептид, содержащий FcRn BP, например, Fc. В предпочитаемых вариантах воплощения химерный полипептид представляет собой Фактор IX-FcRn BP, например, Фактор IX-Fc химерный полипептид, а второй полипептид состоит полностью из Fc. См., например, Фигуру 1, Примеры 1-3 и Таблицу 2 (SEQ ID NOs:2 и 4). См., например, US 7404956, которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.
- [070] Второй полипептид в гибриде содержит или полностью состоит из последовательности, не менее, чем на 90% или не менее, чем на 95% или 100% идентичной аминокислотной последовательности, показанной в Таблице 2В без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 227 из SEQ ID NO:4), или альтернативно, с сигнальной последовательностью.
- [071] Полипептид настоящего изобретения также включает Фактор IX, гибридизированный с одним или более XTEN полипептидами. Schellenburger et al., Nat. Biotech. 27:1186-90 (2009), которая включена в настоящую заявку во всей

полноте посредством ссылки. Фактор IX может быть гибридизирован или с N-концом XTEN полипептида, или с C-концом XTEN полипептида. XTEN полипептиды включают, но не ограничиваясь тем самым, полипептиды, раскрытые в WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682, и US 2009/0092582, каждая из которых включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.

- [072] "Интервал дозирования" при использовании здесь означает количество времени, которое проходит между повторными дозами, вводимыми пациенту. Интервал дозирования в способах изобретения, использующих химерный FIX-FcRn BP, например, химерный FIX-Fc, может быть не менее, чем от полутора до восьми раз длиннее, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентного количества (в МЕ/кг) указанного Фактора IX без FcRn BP, например, Fc части (то есть полипептида, состоящего из указанного FIX). Интервал дозирования при введении, например, Фактора IX-Fc химерного полипептида (или гибрида) изобретения может быть не менее, чем в полтора раза длиннее, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентного количества указанного Фактора IX без FcRn BP, например, Fc, portion (то есть полипептида, состоящего из указанного Фактора IX). Интервал дозирования может быть не менее чем от полутора до восьми раз длиннее, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентного количества указанного Фактора IX без, например, Fc части (или полипептида, состоящего из указанного Фактора IX).
- [073] В некоторых вариантах воплощения интервал дозирования составляет 6-18, 6-10, 9-18, не менее, чем 6, не менее, чем 7, не менее, чем 8, не менее, чем 9, не менее, чем 10, не менее, чем 11, не менее, чем 12, не менее, чем 13, не менее, чем 14, не менее, чем 15, не менее, чем 16, не менее, чем 17 или не менее, чем 18 дней. Интервал дозирования может быть не менее, чем около одного раза в неделю, и может составлять 6-10 дней, например, около 7-10, около 7-9, около 7-8, около 8-10, около 9-10, около 6-7, около 8-9, около 6, около 7, около 8, около 9, или около 10 дней.
- [074] Интервал дозирования может составлять 9-18 дней, например, около 9-17, около 9-16, около 9-15, около 9-14, около 9-13, около 9-12, около 9-11, около 9-10 дней, около 10-18, около 11-18, около 12-18, около 13-18, около 14-18, около 15-18, около 16-18, около 17-18 дней, около 10-11, около 11-12, около 12-13, около 13-14, около 14-15, около 15-16, и около 16-17 дней, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, или около 18 дней. Интервал дозирования может составлять около 10-14 дней. Интервал дозирования может

составлять примерно каждые две недели или два раза в месяц. Интервал дозирования может составлять более, чем 18 дней, например, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, или около 40 дней. Интервал дозирования может быть фиксированным интервалом, например, 7 дней для 25-50 МЕ/кг, 10-13 дней для 50-100 МЕ/кг или 14 дней для 100-150 МЕ/кг. Фиксированный интервал и доза определяются так, что комбинация интервала и дозы будут приводить к минимальному уровню не менее, чем около 1-5 или не менее, чем около 1-3, или не менее, чем около 1, не менее, чем около 2, или не менее, чем около 3 МЕ/дл FIX активности в популяции пациентов или у отдельного пациента. Фиксированный интервал дозирования может также составлять 7 дней для 20-50 МЕ/кг, 10-14 дней для 50-100 МЕ/кг, 14-16 дней для 100-150 МЕ/кг, 7 дней для 10-50 МЕ/кг, 10-13 дней для 15-100 МЕ/кг, или 14-15 дней для 50-150 МЕ/кг. Фиксированный интервал дозирования может также составлять 7 дней для 10-30 МЕ/кг, 10 дней для 15-50 МЕ/кг, 11 дней для 20-70 МЕ/кг, 12 дней для 25-85 МЕ/кг, 13 дней для от 30 до 100 МЕ/кг, 14 дней для от 40 до 125 МЕ/кг и 15 дней для 50-150 МЕ/кг.

[075] В предпочитаемых вариантах воплощения интервал дозирования составляет 20 МЕ/кг один раз в неделю, 40 МЕ/кг каждые 10 дней или 100 МЕ/кг каждые две недели (два раза в месяц).

[076] Интервал дозирования может, альтернативно, быть индивидуализированным интервалом, который определен для каждого пациента на основании фармакокинетических данных или другой информации об этом пациенте. Комбинация индивидуализированной дозы/интервала дозирования может быть такой же, как для заданных интервальных режимов в предшествующих параграфах, или может отличаться, как проиллюстрировано в Примерах. Режим может первоначально быть с фиксированным интервалом дозирования, и потом может измениться на индивидуализированный интервал дозирования.

[077] "Лечение по необходимости" при использовании здесь означает лечение, которое предназначено для применения в течение короткого времени и соответствует существующему состоянию, такому как эпизод кровотечения, или выявленная кратковременная необходимость, такая как планируемое хирургическое вмешательство. Состояния, которые могут требовать лечения по необходимости, включают эпизод кровотечения, гемартроз, мышечное кровотечение, ротовое кровотечение, геморрагию, кровоизлияние в мышцу,

ротовое кровоизлияние, травму, травму головы, желудочно-кишечное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, внутрибрюшинное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, перелом кости, кровотечение центральной нервной системы, кровотечение в заглоточном пространстве, кровотечение в забрюшинном пространстве или кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Прочие эпизоды кровотечения также включены. Пациент может нуждаться в оперативной профилактике, периоперативном уходе или подготовке к операции. Такие операции включают малое хирургическое вмешательство, большое хирургическое вмешательство, удаление зуба, тонзиллэктомию, другие стоматологические/грудные и лицевые операции, сечение паховой грыжи, синовэктомию, полную замену коленного сустава, замену других суставов, краниотомию, остеосинтез, травматическую хирургию, внутричерепные операции, внутрибрюшные операции, внутригрудные операции. Прочие операции также включены. Дополнительные состояния, которые могут требовать лечения по необходимости, включают перечисленные в Таблице 26.

[078] Дополнительные состояния, которые могут требовать лечения по необходимости, включают малое кровоизлияние, гемартроз, поверхностное мышечное кровоизлияние, кровоизлияние в мягкие ткани, среднее кровоизлияние, внутримышечное кровоизлияние или кровоизлияние в мягкие ткани с расслоением, кровоизлияние в слизистые, гематурию, сильное кровоизлияние, глоточное кровоизлияние, заглоточное кровоизлияние, забрюшинное кровоизлияние, кровоизлияние центральной нервной системы, ушибы, порезы, царапины, суставное кровоизлияние, носовое кровотечение, ротовое кровотечение, кровотечение из десен, внутричерепное кровотечение, внутрибрюшинное кровотечение, малое спонтанное кровоизлияние, кровотечение после серьезной травмы, средний кожный кровоподтек или спонтанное кровоизлияние в суставы, мышцы, внутренние органы либо в мозг. Дополнительные причины для лечения по необходимости включают необходимость в периоперативном уходе при хирургическом вмешательстве или удалении зуба, большое хирургическое вмешательство, обширные операции в полости рта, урологические операции, операции на грыже, ортопедические операции, такие как замена коленного, тазобедренного или любого другого основного сустава.

[079] Аббревиатуры:

AUC _{INF}	Площадь под кривой концентрация-время от нуля до бесконечности
AUC _α	Площадь под кривой концентрация-время над фазой распределения
AUC _β	Площадь под кривой концентрация-время над фазой выведения
Альфа HL	Полупериод фазы распределения
Бета HL	Полупериод фазы выведения; также обозначается как t _{1/2}
C168	Оцененная FIXFc активность выше базовой через примерно 168 ч после дозы
C _{max}	Максимальная концентрация, присутствующая на T _{max}
CV%	Процент коэффициента вариации
Cl	Клиренс
IVR	<i>in vivo</i> увеличение концентрации (%)
К-значение	Увеличение концентрации
MRT	Среднее время удержания
N	Номер
NC	Не рассчитывалось
NR	Не сообщалось
SD	Стандартное отклонение
SE	Стандартная ошибка
TBLP1	Модель-прогнозированное время после дозы, когда FIXFc активность уменьшается до примерно 1 МЕ/дл выше базового уровня
TBLP3	Модель-прогнозированное время после дозы, когда FIXFc активность уменьшается до примерно 3 МЕ/дл выше базового уровня
TBLP5	Модель-прогнозированное время после дозы, когда FIXFc активность уменьшается до примерно 5 МЕ/дл выше базового уровня
V _{ss}	Объем распределения на стационарной фазе
V ₁	Объем распределения в центральном компартменте

[080] Фармакокинетические (ПК) параметры включают вышеуказанные термины и следующие термины, которые имеют свое обычное значение в данной области техники, если не указано иное. Некоторые из терминов более детально объясняются в Примерах. ПК параметры могут основываться на уровне FIX антигена (часто обозначенном в настоящей заявке в скобках как "антиген") или уровень FIX активности (часто обозначенном в настоящей заявке в скобках как "активность"). В литературе ПК параметры часто основываются на уровне FIX активности из-за присутствия в плазме некоторых пациентов эндогенных

неактивных FIX, которые служат помехой возможности оценить введенный (т.е. экзогенный) FIX, используя антитело к FIX. Однако когда FIX вводится как часть гибридного белка, содержащего гетерологичный пептид, такой как FcRn BP, вводимый (то есть экзогенный) FIX антиген может быть точно измерен с использованием антитела к гетерологичному полипептиду. Кроме того, определенные PK параметры могут быть основаны на прогнозируемых данных (часто обозначаемых в настоящей заявке в скобках как "модель-прогнозируемые") или на наблюдаемых данных (часто обозначаемых в настоящей заявке в скобках как "наблюдаемое"), и предпочтительно основанные на наблюдаемых данных.

[081] "Базовый" при использовании здесь означает самый низкий подсчитанный уровень Фактора IX в плазме крови у пациента перед введением дозы. В впервые проведенном на человеке исследовании, описанном в Примере 1, уровни Фактора IX в плазме были подсчитаны на двух временных точках перед дозированием: на скрининговом визите и непосредственно перед дозированием. Предозовые времена рассматривались как ноль (базовый уровень) для целей вычислений, то есть для получения данных "с вычетом базового уровня". См., например, Фигуру 4. Альтернативно, (а) базовый уровень у пациентов, чья FIX активность $<1\%$, которые не имеют детектируемый FIX антиген и имеют нонсенс генотипы, определяется как 0% , (b) базовый уровень у пациентов с FIX активностью перед лечением $<1\%$, которые имеют детектируемый FIX антиген, установлен на $0,5\%$, (c) базовый уровень у пациентов, чья FIX активность перед лечением между $1 - 2\%$ - C_{min} (самая низкая активность в ходе PK исследования), и (d) базовый уровень у пациентов, чья FIX активность перед лечением $\geq 2\%$ - 2% . Активность выше базового уровня перед дозированием рассматривается как остаточное лекарство от предыдущего лечения и сводится к базовому уровню и вычитается из PK данных после rFIXFc дозирования. См. Пример 11.

[082] "Площадь под кривой плазматическая концентрация по отношению к времени" ("AUC"), которая, при использовании здесь, основывается на скорости и протяженности элиминации Фактора IX после введения. AUC определяется на определенном временном периоде, таком как 12, 18, 24, 36, 48 или 72 часов, или для бесконечности с использованием экстраполяции, основанной на угле наклона кривой. Если здесь не указано иное, AUC определяется для бесконечности (AUC_{INF}). AUC также может быть подсчитано на основании дозы. Как со многими другими PK параметрами, определение AUC может быть проведено на одном пациенте или на популяции пациентов, по которой подсчитано среднее. В Примере

1 среднее AUC/доза в популяции пациентов было 32,44 МЕ*ч/дл на МЕ/кг и диапазон для отдельных пациентов составлял 21,80-54,30 МЕ*ч/дл на МЕ/кг. (См. Таблицу 13 для средней AUC/доза, основанной на активности.) Следовательно, среднее AUC/доза в популяции пациентов может быть около 26-40, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39 или около 40 МЕ*ч/дл на МЕ/кг. См. Таблицу 14 для AUC/дозы и других AUC параметров, основанных на антигене.

[083] "In vivo увеличение концентрации" ("IVR") представлено нарастающим увеличением концентрации (К-значение), которое означает наблюдаемый пик активности минус преддозовый уровень, разделенные на дозу. IVR также может быть рассчитано на основе процентов, как описано в Примерах. Для ясности, в настоящей заявке используются единицы (К-значение или МЕ/дл на МЕ/кг по отношению к %). Среднее IVR можно определить в популяции пациентов, или индивидуальное IVR можно определить у отдельного пациента. FIXFc, использованное в впервые проведенном на человеке исследовании, описанном в Примере 1, выражало среднее IVR около 0,93 МЕ/дл на МЕ/кг в популяции пациентов; и IVR у каждого пациента, которое варьировало от 0,62 до 1,17 МЕ/дл на МЕ/кг (Таблица 13). Следовательно, химерный полипептид изобретения выражает среднее IVR в популяции пациентов 0,85-1,15 (например, около 0,85, около 0,86, около 0,87, около 0,88, около 0,89, около 0,90, около 0,91, около 0,92, около 0,93, около 0,94, около 0,95, около 0,96, около 0,97, около 0,98, около 0,99, около 1,0, около 1,05, около 1,10, около 1,15) и IVR у пациента не менее чем около 0,6, около 0,7, 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,1, или около 1,2 МЕ/дл на МЕ/кг.

[084] "Скорость клиренса" ("CL") при использовании здесь означает оценку способности организма элиминировать лекарство, и выражается как объем плазмы, свободной от лекарства, по прошествии времени. FIXFc, использованный в исследовании, описанном в Примере 1, демонстрировал средний CL около 3,36 мл/час/кг (см. Таблицу 13), который в около 2,5 раза ниже, чем CL (8,2 мл/час/кг) полипептида, состоящего из Фактора IX (BENEFIX™); диапазон CL значений у отдельных пациентов составлял 1,84-4,58 мл/ч/кг. Следовательно, химерный полипептид изобретения демонстрирует средний CL в популяции 3,0-3,72, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7 или 3,72 мл/час/кг. Для CL, основанного на антигене, см. Таблицу 14.

[085] "Среднее время выведения" ("MRT") при использовании здесь означает измерение среднего времени существования лекарственных молекул в организме. FIXFc, использованный в исследовании, описанном в Примере 1, демонстрировал средний

MRT около 68,05 часов (см. Таблицу 13); диапазон MRT значений составлял 53,1-85,8 часов у отдельных пациентов. Следовательно, химерный полипептид изобретения демонстрирует среднее MRT в популяции 60-78, около 60, около 62, около 64, около 66, около 68, около 70, около 72, около 74, около 76, или около 78 часов и MRT у пациента не менее чем около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, или около 90 часов. Для MRT, основанной на антигене, см. Таблицу 14.

[086] " $t_{1/2\beta}$ " или $t_{1/2\beta}$ или "Beta HL," при использовании здесь, означает полупериод, связанный с фазой элиминации, $t_{1/2\beta}=(\ln 2)/\text{константа скорости элиминации}$, связанная с терминальной фазой. В исследовании, описанном в Примере 1, использованный FIXFc показывал среднее $t_{1/2\beta}$ в популяции пациентов, которое составляло около 52,5 часов (см. Таблицу 13) и диапазон $t_{1/2\beta}$ значений у отдельных пациентов составлял 47-60 часов. Следовательно, химерный полипептид изобретения выражает среднее $t_{1/2\beta}$ более чем около 47, около 48, около 49, около 50, около 51, около 52, около 53, около 54, около 55, около 56, около 57, около 58, около 59 или около 60 часов. Для $t_{1/2\beta}$ основанного на антигене, см. Таблицу 14.

[087] "Минимальный уровень" при использовании здесь означает самый низкий уровень активности Фактора IX в плазме, достигнутый после введения дозы химерного полипептида изобретения или другой молекулы Фактора IX и до введения следующей дозы, если оно будет. Минимальный уровень в настоящей заявке используется взаимозаменяемо с "пороговой величиной". Базовые уровни Фактора IX вычитаются из измеренных уровней Фактора IX для расчета минимального уровня. В некоторых вариантах воплощения минимальный уровень составляет 1-5 или 1-3 МЕ/дл после около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13 или около 14 дней. В некоторых вариантах воплощения уровень химерного полипептида в плазме достигает среднего минимального уровня не менее, чем около 1 МЕ/дл после не менее, чем около 6 дней у не менее, чем около 70%, не менее, чем около 80%, не менее, чем около 90%, или около 100% популяции пациентов или достигает минимального уровня не менее, чем около 1, 2, 3, 4, или 5 МЕ/дл после не менее, чем около 6 дней у пациента. В некоторых вариантах воплощения уровень вышеупомянутого химерного полипептида в плазме достигает среднего минимального уровня около 1-5 или 1-3 МЕ/дл. Такой минимальный уровень или средний минимальный уровень может быть достигнут после около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13,

около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, или около 40 дней.

[088] "Объем распределения на стационарной фазе (V_{ss})" при использовании здесь обозначает видимое пространство (объем), в котором распределяется лекарство. V_{ss} = количество лекарства в теле разделенное на концентрацию в плазме на стационарной фазе. В Примере 1 средний V_{ss} , обнаруженный в популяции, составлял около 226 мл/кг, и диапазон у пациентов составлял около 145-365 мл/кг. (См. Таблицу 13.) Таким образом, средний V_{ss} у популяции пациентов может составлять 200-300, около 200, около 210, около 220, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 280, около 290 или около 300 мл/кг. V_{ss} у отдельных пациентов может составлять около 145, около 150, около 160, около 170, около 180, около 190, около 200, около 210, около 220, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 280, около 290, около 300, около 310, около 320, около 330, около 340, около 350, около 360 или около 370 мл/кг. V_{ss} , основанный на антигене, см. в Таблице 14.

[089] "Полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, содержащему ковалентно связанные аминокислотные остатки.

[090] "Полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, содержащему ковалентно связанные нуклеотидные остатки. Полинуклеотиды могут быть ДНК, кДНК, РНК, одонитевыми или двунитевыми. векторами, плазмидами, фагами или вирусами. Полинуклеотиды включают указанные в Таблице 1, которые кодируют полипептиды Таблицы 2 (см. Таблицу 1). Полинуклеотиды также включают фрагменты полинуклеотидов Таблицы 1, например, те, которые кодируют фрагменты полипептидов из Таблицы 2, такие как Фактор IX, Fc, сигнальную последовательность, пропептид, 6His и другие фрагменты полипептидов Таблицы 2.

[091] "Профилактическое лечение" при использовании здесь означает введение Фактора IX полипептида в многократных дозах пациенту временными курсами для повышения уровня активности Фактора IX в плазме крови пациента. Предпочтительно, возросший уровень достаточен для снижения частоты случаев спонтанного кровотечения или предотвращения кровотечения в случае

неожиданного повреждения. Профилактическое лечение уменьшает или предотвращает эпизоды кровотечения, например, те, которые описаны ниже при лечении по необходимости. Профилактическое лечение может быть заданным или может быть индивидуализированным, как обсуждается ниже при "интервале дозирования", например, для компенсации вариабельности между пациентами.

[092] "Пациент" при использовании здесь означает человека или не являющееся человеком млекопитающее. Не являющиеся человеком млекопитающие включают мышей, собак, приматов, обезьян, кошек, лошадей, коров, свиней и других домашних животных и мелких животных. Пациенты также включают педиатрических пациентов, являющихся людьми. Педиатрические пациенты, являющиеся людьми, имеют возраст до 20 лет, предпочтительно до 18 лет, до 16 лет, до 15 лет, до 12 лет, до 11 лет, до 6 лет, до 5 лет, до 2 лет, и от 2 до 11 лет.

[093] Способы изобретения могут практиковаться на пациенте, нуждающемся в контроле или предотвращении кровотечения или эпизодов кровотечения. Такие пациенты включают тех, которые нуждаются в контроле или предотвращении кровотечения при малом кровоизлиянии, гемартрозе, поверхностном мышечном кровоизлиянии, среднем кровоизлиянии, внутримышечном кровоизлиянии или кровоизлиянии в мягкие ткани с расслоением, кровоизлиянии в слизистые, гематурии, сильном кровоизлиянии, глоточном кровоизлиянии, заглоточном кровоизлиянии, забрюшинном кровоизлиянии, кровоизлиянии центральной нервной системы, ушибах, порезах, царапинах, суставном кровоизлиянии, носовом кровотечении, ротовом кровотечении, кровотечении из десен, внутричерепном кровотечении, внутрибрюшинном кровотечении, малом спонтанном кровоизлиянии, кровотечении после серьезной травмы, среднем кожном кровоподтеке или спонтанном кровоизлиянии в суставы, мышцы, внутренние органы либо в мозг. Такие пациенты также включают тех, которые нуждаются в периоперативном уходе, таком как уход при кровотечении, связанном с хирургической операцией или удалением зуба.

[094] "Терапевтическая доза" при использовании здесь означает дозу, посредством которой достигается терапевтическая цель, как описано здесь. Расчет требуемой дозировки полученного из плазмы крови Фактора IX (pdFIX) основывается на эмпирических наблюдениях, что, в среднем, 1 ME pdFIX на кг веса тела повышает активность плазматического Фактора IX приблизительно на 1 ME/дл (1%). На этой основе требуемая дозировка определяется с использованием следующей формулы:

Требуемые единицы = вес тела (кг) x желаемое повышение Фактора IX (МЕ/дл или % от нормы) x 1 (МЕ/кг на МЕ/дл)

[095] Поскольку FIXFc, например, как описано в Примерах и на Фигуре 1, имеет повышение концентрации такое же, как у pdFIX (отличающееся от такового у BENEFIX™), требуемая доза определяется по формуле выше, или слегка подгоняется. См. также в Таблице 26 особые рекомендованные дозы для различных вариантов лечения по требованию. Для педиатрических пациентов, использующих pdFIX, руководство по дозировке такое же, как для взрослых. Однако педиатрические пациенты могут иметь более долгое повышение концентрации, и следовательно дозировку может быть необходимо в соответствии с этим изменять.

[096] Терапевтические дозы, которые могут быть использованы в способах изобретения, составляют 10-180, 20-180 или 25-180 МЕ/кг, более определенно, предпочитаемые дозы для 6-10 дневного интервала дозирования являются следующими: около 25-110, около 30-110, около 40-110, около 50-110, около 60-110, около 70-110, около 80-110, около 90-110 и около 100-110; около 30-100, около 30-90, около 30-80, около 30-70, около 30-60, около 30-50, около 30-40 МЕ/кг; около 40-110, около 50-100, около 60-90 и около 70-80 МЕ/кг; около 40-50, около 50-60, около 60-70, около 70-80, около 80-90, около 90-100 и около 100-110 МЕ/кг; около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105 и около 110 МЕ/кг. 6-10 дневный интервал дозирования включает недельный интервал дозирования. Дополнительные терапевтические дозы для 6-10 дневного, например, недельного интервала дозирования, включают 20-50, 20-100 и 20-180 МЕ/кг, более определенно, предпочитаемые дозы для 6-10 дневного, например, недельного интервала дозирования являются следующими: около 20-110, около 20-100, около 20-90, около 20-80, около 20-70, около 20-60, около 20-50, около 20-40, около 20-30, около 20-40 и около 20 МЕ/кг. См. также Примеры 10 и 11. Дозы могут быть ниже, чем 20 МЕ/кг, если это эффективно для данного пациента, например, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18 или около 19 МЕ/кг.

[097] Предпочитаемые терапевтические дозы для 9-18 дневного, например, два раза в месяц, интервала дозирования являются следующими: около 50-180, около 60-180, около 70-180, около 80-180, около 90-180, около 100-180, около 110-180, около 120-

180, около 130-180, около 140-180, около 150-180, около 160-180 и около 170-180 МЕ/кг; около 90-170, около 90-160, около 90-150, около 90-140, около 90-130, около 90-120, около 90-110 и около 90-100 МЕ/кг; около 100-170, около 110-160, около 120-150, и около 130-140 МЕ/кг; около 90-100, около 100-110, около 110-120, около 120-130, около 130-140, около 140-150, около 150-160 и около 160-170 МЕ/кг; около 60, около 70, около 80, около 90, около 95, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145, около 150, около 155, около 160, около 165, около 170, около 175 и около 180 МЕ/кг. См. также Примеры 10 и 11.

[098] Предпочитаемые терапевтические дозы составляют 10-50, 15-100, 20-100, 20-50, 50-100, 10, 20, 40, 50 и 100 МЕ/кг.

[099] Терапевтическая доза может составлять около 20-50, около 20-100, около 20-180, 25-110, около 30-110, около 40-110, около 50-110, около 60-110, около 70-110, около 80-110, около 90-110, около 100-110, около 30-100, около 30-90, около 30-80, около 30-70, около 30-60, около 30-50, около 30-40 МЕ/кг, около 40-110, около 50-100, около 60-90, около 70-80 МЕ/кг, около 40-50, около 50-60, около 60-70, около 70-80, около 80-90, около 90-100, около 100-110 МЕ/кг, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105 и около 110 МЕ/кг. Такие дозы предпочтительны для интервалов дозирования около 6-10, около 7-10, около 7-9, около 7-8, около 8-10, около 9-10, около 6-7, около 8-9, около 6, около 7, около 8, около 9 и около 10 дней, и один раз в неделю.

[0100] Терапевтическая доза может составлять около 90-180, около 100-180, около 110-180, около 120-180, около 130-180, около 140-180, около 150-180, около 160-180 и около 170-180 МЕ/кг. Доза может составлять около 90-170, около 90-160, около 90-150, около 90-140, около 90-130, около 90-120, около 90-110 и около 90-100 МЕ/кг. Доза может составлять около 100-170, около 110-160, около 120-150 и около 130-140 МЕ/кг. Доза может составлять около 90-100, около 100-110, около 110-120, около 120-130, около 130-140, около 140-150, около 150-160 и около 160-170 МЕ/кг. Доза может составлять около 90, около 95, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145, около 150, около 155, около 160, около 165, около 170, около 175 и около 180 МЕ/кг. Такие дозы предпочтительны для интервала дозирования около 9-18, около 9-17, около 9-16, около 9-15, около 9-14, около 9-13, около 9-12, около 9-11, около 9-10, около 10-18, около 11-18, около 12-18, около 13-18, около 14-18, около 15-18, около

16-18, около 17-18, около 10-11, около 11-12, около 12-13, около 13-14, около 14-15, около 15-16 и около 16-17 дней, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17 и около 18 дней, один раз в месяц и два раза в месяц (каждые две недели).

[0101] Предпочитаемая терапевтическая доза и интервалы дозирования являются следующими: 20 МЕ/кг один раз в неделю, 40 МЕ/кг каждые 10 дней, и 100 МЕ/кг каждые две недели (дважды в месяц). Дополнительные комбинации дозы и дозового интервала включают: дозу не менее, чем около 50 МЕ/кг и интервал дозирования не менее, чем около 7 дней, дозу не менее, чем около 100 МЕ/кг и интервал дозирования не менее, чем около 9 дней, дозу не менее, чем около 100 МЕ/кг и интервал дозирования не менее, чем около 12 дней, дозу не менее, чем около 150 МЕ/кг и интервал дозирования не менее, чем около 14 дней, 20-50 или 20-100 МЕ/кг и указанный интервал дозирования представляет собой один раз в неделю, доза 20-50 МЕ/кг и интервал дозирования 7 дней, доза 50-100 МЕ/кг и интервал дозирования 10-14 дней, или доза 100-150 МЕ/кг и интервал дозирования 14-16 дней. Предпочитаемые комбинации интервала дозирования и дозы также включают 10-50 МЕ/кг для 7 дней, 15-100 МЕ/кг для 10-13 дней, 50-150 МЕ/кг для 14-15 дней, 10-30 МЕ/кг для 7 дней, 15-50 МЕ/кг для 10 дней, 20-70 МЕ/кг для 11 дней, 25-85 МЕ/кг для 12 дней, от 30 до 100 МЕ/кг для 13 дней, от 40 до 125 МЕ/кг для 14 дней, и 50-150 МЕ/кг для 15 дней.

[0102] "Вариант" при использовании здесь означает полинуклеотид или полипептид, отличный от исходного полинуклеотида или полипептида, но сохраняющий его основные свойства, например, коагулирующую активность Фактора IX или Fc (FcRn-связывающую) активность. Обычно варианты в целом сходны и на многих участках идентичны исходным полинуклеотидам или полипептидам. Варианты включают фрагменты полинуклеотидов и полипептидов, делеции, вставки и модифицированные версии исходных полипептидов.

[0103] Вариантные полинуклеотиды могут содержать или же, альтернативно, состоять из последовательности нуклеотидов, не менее, чем на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной, например, кодирующей последовательности нуклеотидов в SEQ ID NO:1 или 3 (участок Фактора IX, участок Fc, по отдельности или вместе) или соответствующей ей комплементарной нити, последовательности нуклеотидов, кодирующей известные мутантные и рекомбинантные Фактор IX или Fc, как то раскрытые в процитированных здесь публикациях и патентах, или

соответствующей ей комплементарной нити, последовательности нуклеотидов, кодирующей полипептид SEQ ID NO:2 или 4 (участок Фактора IX, участок Fc, по отдельности или вместе), и/или полинуклеотидным фрагментам любой из этих нуклеиновых кислот (например, их фрагментам, описанным здесь). Полинуклеотиды, которые гибридизируются с этими молекулами нуклеиновых кислот при строгих условиях гибридизации или в менее строгих условиях, также включаются как варианты, равно как и полипептиды, кодируемые этими полинуклеотидами в случае их функциональности.

[0104] Вариантные полипептиды могут содержать, или, альтернативно, состоять из последовательности аминокислот, не менее чем на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной, например, последовательности полипептидов, показанной в SEQ ID NO:2 или 4 (участок Фактора IX, участок Fc, по отдельности или вместе), и/или полипептидным фрагментам любого из этих полипептидов (например, описанным здесь фрагментам).

[0105] Под нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность нуклеотидов, "идентичную" эталонной последовательности нуклеотидов не менее чем, например, на 95%, подразумевается, что последовательность нуклеотидов в нуклеиновой кислоте идентична эталонной последовательности, за тем исключением, что эта последовательность нуклеотидов может включать до пяти точковых мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной последовательности нуклеотидов. Другими словами, чтобы получить нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеотидов, не менее, чем на 95% идентичную эталонной последовательности нуклеотидов, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами, либо нуклеотиды в количестве до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Запрашиваемой последовательностью может быть, например, целая последовательность, показанная в SEQ ID NO:1 или 3, ORF (открытая рамка считывания) или любой фрагмент, определенный как описанный здесь.

[0106] На практике, является ли любая конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептида не менее чем на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеотидов или полипептиду настоящего изобретения, можно установить конвенциональным путем с использованием известных компьютерных программ. Предпочтительный способ установления лучшего общего совпадения между запрашиваемой последовательностью (эталонной или

исходной последовательностью) и исследуемой последовательностью, также известный как глобальное выравнивание последовательностей, может быть выбран при помощи компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. В выравнивании последовательностей как запрашиваемая, так и исследуемая последовательности являются последовательностями ДНК. Последовательность РНК может быть сравнена путем конвертации U в T. Результат вышеозначенного глобального выравнивания последовательностей дается в процентном соотношении. Предпочтительные параметры, применяемые в выравнивании последовательностей ДНК при помощи FASTDB для вычисления процентного соотношения: Матрица=Единичная, k-кратный=4, Поправочный коэффициент за несогласование=1, Поправочный коэффициент за сшивание = 30, Длина группы рандомизации=0, Порог=1, Поправочный коэффициент за гэп = 5, Поправочный коэффициент размера гэпа 0,05, Размер окна = 500 либо длине исследуемой последовательности нуклеотидов, если она короче.

[0107] Если исследуемая последовательность короче запрашиваемой последовательности вследствие делеций 5' или 3', но не вследствие внутренних делеций, результаты должны быть откорректированы вручную. Это потому, что программа FASTDB не учитывает усечения 5' и 3' исследуемой последовательности при вычислении процентного соотношения. Для исследуемых последовательностей, усеченных на окончаниях 5' или 3' относительно запрашиваемой последовательности, процентное соотношение корректируется путем вычисления количества оснований в запрашиваемой последовательности, которые являются 5' и 3' в исследуемой последовательности, и которые не совпадают / выровнены, в процентах от общего числа оснований в запрашиваемой последовательности. Совпадает / выровнен ли нуклеотид, определяется по результатам выравнивания последовательностей FASTDB. Этот процент затем вычитается из процентного соотношения, вычисленного вышеупомянутой программой FASTDB с использованием установленных параметров, для получения итогового значения процентного соотношения. Это откорректированное значение и используется для целей настоящего изобретения. Только основания, расположенные вне оснований 5' и 3' исследуемой последовательности, согласно показаниям выравнивания FASTD, которые не совпадают / выровнены с запрашиваемой последовательностью, учитываются в целях ручной правки значения процентного соотношения.

[0108] Например, исследуемая последовательность из 90 оснований выровнена с запрашиваемой последовательностью из 100 оснований для определения процентного соотношения. Делеции присутствуют на окончании 5' исследуемой последовательности, и следовательно, выравнивание FASTDB не показывает совпадения / выравнивания первых 10 оснований на окончании 5'. Эти 10 непарных оснований представляют собой 10% последовательности (число несовпавших оснований на окончаниях 5' и 3' / общее число оснований в запрашиваемой последовательности), следовательно, 10% вычитаются из значения процентного соотношения, вычисленного программой FASTDB. Если остальные 90 оснований совпадают идеально, итоговое процентное соотношение будет 90%. В другом примере исследуемая последовательность из 90 оснований сравнивается с запрашиваемой последовательностью из 100 оснований. На этот раз делеции являются внутренними делециями, так что отсутствуют основания на 5' или 3' исследуемой последовательности, которые не совпадают / выровнены с запрашиваемой. В таком случае, процентное соотношение, вычисленное FASTDB, вручную не корректируется. Только для оснований 5' и 3' исследуемой последовательности, которые не совпадают / выровнены с запрашиваемой последовательностью, выполняется ручная коррекция. Никакие другие ручные коррекции не требуются для целей настоящего изобретения.

[0109] Под полипептидом, содержащим последовательность аминокислот, "идентичную" запрашиваемой последовательности аминокислот настоящего изобретения не менее чем, например, на 95%, подразумевается, что последовательность аминокислот исследуемого полипептида идентична запрашиваемой последовательности, за тем исключением, что исследуемая последовательность полипептидов может включать до пяти изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот запрашиваемой последовательности аминокислот. Другими словами, чтобы получить полипептид, содержащий последовательность аминокислот, не менее чем на 95% идентичную запрашиваемой последовательности аминокислот, до 5% аминокислотных остатков в исследуемой последовательности могут быть вставлены, удалены или заменены другими аминокислотами. Такие изменения в эталонной последовательности могут присутствовать на амино- или карбокси-терминальных позициях эталонной последовательности аминокислот либо где угодно между этими терминальными позициями, поодиночке среди остатков в эталонной последовательности или в виде одной или более слитных групп в пределах эталонной последовательности.

[0110] На практике, является ли любой конкретный полипептид не менее, чем на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным, например, последовательности аминокислот в SEQ ID NO:2 (участок Фактора IX, участок Fc, по отдельности или вместе) или 4, либо известной полипептидной последовательности Фактора IX или Fc, можно установить конвенциональным путем с использованием известных компьютерных программ. Предпочтительный способ установления лучшего общего совпадения между запрашиваемой последовательностью (эталонной или исходной последовательностью) и исследуемой последовательностью, также известный как глобальное выравнивание последовательностей, может быть выбран при помощи компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. В выравнивании последовательностей как запрашиваемая, так и исследуемая последовательности являются последовательностями нуклеотидов, либо как запрашиваемая, так и исследуемая последовательности являются последовательностями аминокислот. Результат вышеозначенного глобального выравнивания последовательностей дается в процентном соотношении. Предпочтительные параметры, применяемые в выравнивании аминокислот при помощи FASTDB для вычисления процентного соотношения: Матрица=PAM 0, k-кратный=2, Поправочный коэффициент за несогласование=1, Поправочный коэффициент за сшивание = 20, Длина группы рандомизации=0, Порог=1, Размер окна=длина последовательности, Поправочный коэффициент за гэл = 5, Поправочный коэффициент размера гэпа 0,05, Размер окна = 500 либо длине исследуемой последовательности нуклеотидов, если она короче.

[0111] Если исследуемая последовательность короче запрашиваемой последовательности вследствие N- или C-концевых делеций, но не вследствие внутренних делеций, результаты должны быть откорректированы вручную. Это потому, что программа FASTDB не учитывает N- и C-концевые усечения исследуемой последовательности при вычислении итогового процентного соотношения. Для исследуемых последовательностей, усеченных на N- и C-концах относительно запрашиваемой последовательности, процентное соотношение корректируется путем вычисления количества остатков в запрашиваемой последовательности, которые являются N- и C-концевыми в исследуемой последовательности, и которые не совпадают / выровнены с соответствующими исследуемыми остатками, в процентах от общего числа оснований в запрашиваемой последовательности. Совпадает / выровнен ли остаток, определяется по результатам выравнивания последовательностей

FASTDB. Этот процент затем вычитается из процентного соотношения, вычисленного вышеупомянутой программой FASTDB с использованием установленных параметров, для получения итогового значения процентного соотношения. Это откорректированное значение и используется для целей настоящего изобретения. Только остатки на N- и С-концах исследуемой последовательности, которые не совпадают/выровнены с запрашиваемой последовательностью, учитываются в целях ручной правки значения процентного соотношения. Иными словами, только позиции остатков в запрашиваемой последовательности, расположенные за пределами наиболее удаленных N- и С-терминальных остатков исследуемой последовательности.

[0112] Например, исследуемая последовательность из 90 аминокислотных остатков выровнена с запрашиваемой последовательностью из 100 аминокислотных остатков для определения процентного соотношения. Делеции присутствуют на N-конце исследуемой последовательности, и следовательно, выравнивание FASTDB не показывает совпадения/выравнивания первых 10 остатков на N-конце. Эти 10 непарных остатков представляют собой 10% последовательности (число не совпавших остатков на N- и С-концах / общее число остатков в запрашиваемой последовательности), следовательно, 10% вычитаются из значения процентного соотношения, вычисленного программой FASTDB. Если остальные 90 остатков совпадают идеально, итоговое процентное соотношение будет 90%. В другом примере, исследуемая последовательность из 90 остатков сравнивается с запрашиваемой последовательностью из 100 остатков. На этот раз делеции являются внутренними делециями, так что отсутствуют основания на N- и С-концах исследуемой последовательности, которые не совпадают / выровнены с запрашиваемой. В таком случае, процентное соотношение, вычисленное FASTDB, вручную не корректируется. Только для позиций остатков, расположенных за пределами N- и С-концов исследуемой последовательности, согласно показаниям выравнивания FASTDB, которые не совпадают / выровнены с запрашиваемой последовательностью, выполняется ручная коррекция. Никакие другие ручные коррекции не требуются для целей настоящего изобретения.

[0113] Варианты полинуклеотида могут содержать изменения в кодирующих участках, не кодирующих участках, или и там, и там. Наиболее предпочтительны варианты полинуклеотида, содержащие изменения, которые производят молчащие замены, вставки или делеции, но не изменяют свойства и активность кодируемого

полипептида. Предпочтительны варианты нуклеотида, произведенные посредством молчащей замены вследствие дегенерации генетического кода. Помимо того, предпочтительны варианты, в которых 5-10, 1-5, или 1-2 аминокислоты заменены, удалены или вставлены в любом сочетании. Варианты полинуклеотида могут быть произведены с различными целями, например, для оптимизации экспрессии кодонов в конкретном носителе (заменить кодоны в человеческой иРНК на предпочтительные для бактериального носителя, такого как *E. coli*).

[0114] Природные варианты называются "аллельные варианты" и относятся к одной из нескольких различных форм гена, занимающих данный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут различаться на уровне полинуклеотидов и/или на уровне полипептидов и включаются в настоящее изобретение. Альтернативно, неприродные варианты могут быть произведены при помощи техник мутагенеза или прямым синтезом.

[0115] Используя известные способы белковой инженерии и рекомбинантной ДНК-технологии, можно производить варианты с целью улучшить или изменить характеристики полипептидов. Например, одна или более аминокислот могут быть удалены с N-конца или C-конца выделенного белка без значительных потерь в биологической функции. Авторы Ron et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, отмечали, что варианты белка KGF сохраняли гепарин-связывающую активность даже после удаления 3, 8, или 27 аминотерминальных аминокислотных остатков. Подобным же образом, гамма интерферон демонстрировал повышенную до 10 раз активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков с карбокси-конца этого белка. (Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.)

[0116] Более того, существует достаточное количество данных, которые демонстрируют, что варианты нередко сохраняют биологическую активность, подобную активности природного белка. Например, Gayle и сотрудники (*J. Biol. Chem.* 268:22105-22111 (1993), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки) провели расширенный мутационный анализ человеческого цитокина IL-1a. Они использовали неспецифический мутагенез для генерации более 3,500 независимых мутантов IL-1a, которые в среднем содержали по 2,5 изменения аминокислот на вариант по всей длине молекулы. Множественные мутации были рассмотрены на каждой из возможных аминокислотных позиций. Исследователи

обнаружили, что «большая часть молекулы может быть изменена без особого влияния на связывающую или биологическую активность») (См. Abstract.) В действительности, только 23 уникальные последовательности аминокислот из более 3,500 исследованных последовательностей нуклеотидов производили белок, значительно отличавшийся по своей активности от дикого типа.

[0117] Как указано выше, варианты полипептидов включают модифицированные полипептиды. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемовой группы, ковалентное присоединение нуклеотида или производной нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производной липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, перекрёстное сшивание, циклизацию, формирование дисульфидных связей, деметилирование, формирование ковалентных сшивок, формирование цистеина, формирование пироглютамата, формилирование, гамма- карбоксилирование, гликозилирование, формирование гликозилфосфатидилинозитола, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристиолирование, окисление, пегилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, тРНК-опосредованная вставка аминокислот в белки, как то аргинилирование, и убиквитинирование.

[0118] Термин "около" применяется здесь в значении «приблизительно», «округленно», «примерно» или «в районе». Когда термин "около" используется в сочетании с областью числовых значений, он модифицирует эту область путем расширения ее пределов выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин "около" используется здесь для модификации числового значения на величину в 10%, как вверх, так и вниз (больше или меньше).

[0119] Теперь, когда мы описали настоящее изобретение детально, все то же можно полнее уяснить посредством отсылки к нижеследующим примерам, которые включены сюда только в целях иллюстрации и не ограничивают это изобретение. Все приведенные здесь патенты и публикации включены полностью посредством ссылки.

[0120] Исследование, впервые поставленное на человеке, было открытым, с эскалацией дозы, Фаза 1/2 исследованием для определения безопасности, переносимости и фармакокинетических (ФК) параметров FIXFc (рекомбинантный гибридный белок

человеческого коагуляционного фактора IX). FIXFc представляет собой рекомбинантный гибридный белок, содержащий человеческий свертывающий фактор IX, соединенный с Fc доменом из человеческого IgG1. Гибридный белок экспрессируется в человеческих эмбриональных почечных клетках (HEK 293). См. Пример 3.

- [0121] FIXFc разработан для контроля и предотвращения геморрагических случаев у пациентов с гемофилией В (врожденный дефицит фактора IX или болезнь Кристмаса), включая контроль и предотвращение кровотечения при хирургических вмешательствах.
- [0122] FIXFc представляет собой рекомбинантный гибридный белок, содержащий коагуляционный Фактор IX (FIX) и Fc домена человеческого антитела (IgG1 изотип). Молекула FIXFc представляет собой гетеродимер с одной цепью FIXFc (FIXFc-sc) и одной цепью Fc (Fc-sc), связанными вместе посредством двух дисульфидных связей в петлевом участке Fc. См. Фигуру 1 и Таблицу 2.
- [0123] rFIXFc лекарственный продукт представляет собой прозрачный бесцветный раствор, предназначенный для внутривенного (ВВ) введения. rFIXFc поставляется как 1000 МЕ на объем 5 мл в 10 мл ампуле одноразового использования. Лекарственный Продукт упаковывается в USP тип I стеклянные ампулы с бромбутиловыми пробками и отрывными простыми алюминиевыми дополнительными закупорочными средствами. rFIXFc лекарственный продукт содержит 200 МЕ/мл в 10мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.0 с добавлением 145 мМ NaCl и 0.1% полисорбата 20. Раствор rFIXFc не следует растворять.
- [0124] Дизайн Исследования. Пациенты общим числом 14, ранее подвергавшиеся лечению, с тяжелой гемофилией В, были включены в исследование и обработаны FIXFc путем внутривенного (ВВ) вливания в течение приблизительно 10 минут. В исследовании оценивалось шесть дозовых уровней, 1; 5; 12,5; 25; 50 и 100 МЕ/кг. Один пациент на дозовый уровень был включен в исследование дозовых уровней 1; 5; 12,5 и 25 МЕ/кг, и по меньшей мере три подлежащих оценке пациента на дозовый уровень были включены в исследование 50 и 100 МЕ/кг.
- [0125] После скрининга (назначенного в течение 14 дней FIXFc дозы) начался период лечения пациентов. Период лечения для каждого дозового уровня включал одну дозу FIXFc (День 1) до завершения 72-часового периода наблюдения безопасности (3 дня) для дозовых уровней 1 и 5 МЕ/кг или до момента взятия последней пробы РК для пациентов в случае дозовых уровней от 12,5 до 100 МЕ/кг (приблизительно 10 дней). Пациенты, обработанные 1; 5; 12,5 или 25 МЕ/кг были включены в

исследование и обработаны последовательным образом начиная с 1 МЕ/кг. Пациенты, получившие 50 МЕ/кг, не получали больше лечения в тот же день, и по меньшей мере один день разделял дозирование. После лечения пациентов 50 МЕ/кг, начиналось лечение пациентов 100 МЕ/кг.

- [0126] Период после лечения был 30-дневным периодом наблюдения за безопасностью, начинавшимся со дня, когда пациент получал дозу FIXFc, и частично совпадавшим с периодом лечения с того момента, когда пациенты подвергались требуемым оценочным исследованиям, таким как взятие проб РК, в течение этого времени.
- [0127] У пациентов, которым были назначены дозовые уровни от 12,5 до 100 МЕ/кг, брались образцы крови для оценки FIX активности и FIXFc концентрации. Образцы крови брались непосредственно перед введением FIXFc; через 15 минут после конца вливания; и на 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96, 120, 168 и 240 часах после конца вливания или до того как были достигнуты базовые уровни FIX. Если у пациента продолжали наблюдаться уровни FIX выше базового на 240-часовой временной точке (День 11 Исследования), образцы брались на 288 часах (День 13 Исследования) и снова на 336 часах (День 15 Исследования), если уровень FIX был выше базового на День 13 Исследования.
- [0128] Пациент 10 получил BENEFIX™ лечение кровотечения перед назначенным взятием FIXFc образца на 216 часов после дозирования. Следовательно, FIXFc активность и данные по антигену на 216 ч и на последующих временных точках были исключены из анализа. Не произошло дополнительных отклонений, которые, как считается, повлияли бы на предварительные результаты анализа в этом исследовании.
- [0129] Для Фактора IX антигена фармакокинетические анализы были проведены на отдельном пациенте, наблюдалась концентрация FIXFc в соответствии с временными данными после ВВ вливания FIXFc. Первичный анализ был проведен с использованием модель-зависимой методологии. Данные по концентрации FIXFc были компьютерным образом обработаны для двухкомpartmentной открытой модели с элиминацией из центрального компартмента с использованием определенных пользователем оценок первичного параметра для расчета значений исходного параметра. WinNonlin оцененные константы микроскопической степени были выработаны и данные по FIXFc концентрации были оценены по функции $1/(Y^{-\text{hat}} * Y^{-\text{hat}})$. Наблюдаемые данные для двух пациентов (например, пациенты 5 и 6) были недостаточно описаны двухкомpartmentной моделью. Поэтому для этих двух пациентов был проведен модель-независимый анализ с использованием WinNonlin

некомпарментного анализа ВВ-вливания модели входа (линейное правило трапеций для AUC расчета). Для некомпарментного анализа полупериод был рассчитан по бета фазе с использованием точек данных, которые описывают терминальное логарифмически-линейное снижение регрессии. Минимум три точки использовались для описания фазы элиминации. Это произошло приблизительно между 4 и 14 днями. Для РК анализа антигена были использованы “мг/кг” дозовые эквиваленты. Эти значения были определены на основе специфической активности FIXFc 60,2 МЕ/мг. Фактические временные точки взятия проб, дозы и продолжительности вливания были использованы для расчетов. Номинальные временные точки взятия проб и дозы были использованы для создания таблиц и фигур концентрация-время. Представлены индивидуальные и средние РК параметры и описательная статистика. Формальный статистический анализ не был проведен, поскольку дозовый диапазон и число пациентов в каждой когорте были слишком маленькими для предметного анализа.

[0130] Для активности Фактора IX способ вычитания базового уровня был примерен к активности по сравнению с временным профилем в соответствии с деревом решений вычитания базового уровня (Фигура 4). Значения активности < 1% были определены при 1 МЕ/дл для затухания к базовому уровню. Предозовые временные точки считались нулем для целей расчетов. Кроме того, скорректированные по базовому уровню данные активности были округлены по временным точкам, что представляло возвращение к базовым уровням. Фармакокинетический анализ был проведен на FIX-активности с вычетом базового уровня по сравнению с временными точками, полученными после введения FIXFc путем ВВ вливания. Модель-зависимая оценка была использована для анализа ВВ-вливания дозовых групп. Данные с вычетом базового уровня были компьютерным образом обработаны для двухкомпарментной открытой модели с элиминацией из центрального компартмента с использованием WinNonlin-определенных границ параметров для расчета значений исходного параметра. WinNonlin оцененные константы микроскопической степени были выработаны, и данные по FIXFc концентрации были оценены по функции $1/(Y^{-\text{hat}} * Y^{-\text{hat}})$. Фактические временные точки взятия проб, дозы и продолжительности вливания были использованы для расчетов. Номинальные временные точки взятия проб и дозы были использованы для создания таблиц и фигур концентрация-время.

[0131] Если не имелось фактических данных по ним, активность на 168 ч после дозирования (C168) и время при 1 МЕ/дл выше базового уровня (TBLP1) rFIXFc

были получены с использованием WinNonlin произведенных констант микроскопической степени для моделирования уровня активности FIXFc по сравнению с временными данными. Индивидуальные и средние PK параметры и описательная статистика представлены в этом Примере. Формальный статистический анализ не был проведен, поскольку дозовый диапазон и число пациентов в каждой когорте были слишком маленькими для предметного анализа.

[0132] Результаты фармакокинетики FIXFc антигена показали, что концентрации FIXFc в плазме крови резко возрастали после быстрого ВВ вливания FIXFc, со средними ($\pm$ SD) $C_{\max}$ значениями 1670 (n=1), 2730 (n=1), 7510 ± 2480 и 15400 ± 3960 нг/мл для 12,5; 25; 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно, и были достигнуты в течение первого получаса для всех пациентов. Все FIXFc-обработанные пациенты имели дозозависимое возрастание системного FIXFc экспонирования в плазме (как оценивалось по $C_{\max}$ и AUC_{INF}). Хотя и ограниченное одним оцененным пациентом при 12,5 и 25 МЕ/кг номинальной дозе, наблюдаемое увеличение как $C_{\max}$, так и AUC_{INF} было достаточно пропорционально дозе в оцененном дозовом диапазоне. (Таблица 3 показывает среднюю FIXFc антигена концентрацию для отдельных пациентов и групп в сопоставлении с временными данными; рассортировано по номинальной дозе, фактической дозе, длительности вливания и номеру пациента. Таблица 4 показывает средние FIXFc антигена PK суммарные данные, отдельных пациентов и групповые, рассортированные по номинальной дозе, фактической дозе, “мг/кг” эквивалентной дозе и номеру пациента, показывает средние FIXFc антигена PK суммарные данные, отдельных пациентов и групповые, рассортированные по номинальной дозе, фактической дозе, “мг/кг” эквивалентной дозе и номеру пациента, и см. Таблицу 11.)

[0133] Концентрации FIXFc в плазме крови снижались по биекспоненте после короткого ВВ вливания. Периоды полувыведения как значений распределения (альфа), так и элиминации (бета), по видимости, являлись дозозависимыми в интервале доз, оцененных по периодам полувыведения альфа и бета у отдельного пациента в интервале от 9,79 до 21,2 часов и от 71,0 до 140 часов, соответственно. Средние периоды полувыведения альфа ($\pm$ SD) для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли $13,1 \pm 4,77$ и $12,1 \pm 2,33$ часа, соответственно. Средние периоды полувыведения бета ($\pm$ SD) для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли $110 \pm 26,5$ и $95,8 \pm 11,1$ часов, соответственно. Кроме того, были определены первичные значения параметра PK для Cl , V_{ss} , и MRT и, в целом, все, по видимости, являлись дозозависимыми в интервале получивших оценку

доз. Как показано, эта оценка ограничена данными по одному пациенту на 12,5 и 25 МЕ/кг номинальных дозовых уровней (Таблица 12 и Фигуры 2, 7 и 8.)

[0134] Кроме того, средние Cl значения составляли $2,28 \pm 0,374$ и $2,11 \pm 0,464$ мл/ч/кг для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно. Средние V_{ss} значения составляли $259 \pm 78,5$ и $238 \pm 52,2$ мл/кг для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно. Кроме того, средние MRT значения составляли $112 \pm 21,5$ и $114 \pm 17,1$ ч для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней.

[0135] Результаты для скорректированной по базовому уровню фармакокинетической активности $FIXFc$ показали, что $FIXFc$ активность резко возросла после короткого ВВ вливания $FIXFc$, со средними ($\pm SD$) модель-прогнозируемыми C_{max} значениями 11,9 (n=1), 19,9 (n=1), $41,6 \pm 8,97$ и $98,2 \pm 8,21$ МЕ/дл для 12,5, 25, 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно, и была достигнута в течение первого получаса для всех пациентов. (В Таблице 5 показана средняя скорректированная по базовому уровню $FIXFc$ активность в сопоставлении с временными данными; распределены по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности вливания и номеру пациента. В Таблице 6 показаны PK суммарные данные средней $FIXFc$ активности отдельных пациентов и группы; распределены по номинальной дозе, фактической дозе, “мг/кг” эквивалентной дозе и номеру пациента.)

[0136] Все $FIXFc$ -обработанные пациенты имели дозозависимое возрастание FIX активности (по сравнению с базовым ответом перед дозой). Хотя ограниченное тем, что оценивался только один пациент на номинальных дозовых уровнях 12,5 и 25 МЕ/кг, наблюдаемое возрастание как C_{max} , так и AUC_{INF} было достаточно пропорционально дозе внутри оцениваемого дозового диапазона. (Таблицы 6, 9 и 13 и Фигуры 3 и 5.)

[0137] После окончания вливания снижение скорректированной по базовому уровню FIX активности демонстрировало биэкспоненциальный спад; характеризовалось быстрой фазой распределения (альфа), за которой следовала линейная логарифмическая фаза элиминации (бета). Во время альфа-фазы степень уменьшения $FIXFc$ активности варьировала со значениями полупериода альфа у отдельных пациентов от 0,140 до 16,6 часов. Видимое дозозависимое возрастание средних значений полупериода альфа было сбито у одного пациента при 12,5 и 25 МЕ/кг номинальных дозовых уровнях. Напротив, значения полупериода элиминации (бета), по-видимому, являются дозозависимыми при дозовом диапазоне со значениями бета полупериода у отдельных пациентов в диапазоне от

42,1 до 67,4 часов при дозовом диапазоне от 25 до 100 МЕ/кг. Хотя получивший оценку и описанный, полупериод элиминации у пациента 1, получившего лечение 12,5 МЕ/кг rFIXFc, не вошел в суммарную оценку из-за того, что уровни FIX у этого пациента детектировались только в течение периода до 96 часов из-за укороченной терминальной фазы и способствовали недооценке терминального полупериода элиминации. Средние периоды полувыведения бета ($\pm$ SD) для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли $52,1 \pm 10,4$ и $52,5 \pm 10,1$ часов, соответственно, и $52,5 \pm 9,2$ (диапазон 40-67,4) часов для комбинированных 25, 50 и 100 МЕ/кг номинальных доз. (Таблицы 6, 8 и 13).

[0138] Кроме того, были определены первичные значения параметра РК для Cl , V_1 , V_{ss} и MRT и, в целом, все, по-видимому, были дозозависимыми в оцененном диапазоне доз.

[0139] Кроме того, средние значения Cl составляли $3,77 \pm 1,12$ и $2,89 \pm 0,615$ мл/ч/кг для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно, и $3,36 \pm 0,928$ мл/ч/кг для комбинированных 25, 50 и 100 МЕ/кг номинальных доз. (Таблицы 6, 8 и 13.)

[0140] Средние значения V_{ss} составляли $264 \pm 77,6$ и $179 \pm 31,1$ мл/кг для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно, и $226 \pm 69,8$ мл/кг для комбинированных 25, 50, и 100 МЕ/кг номинальных доз. (Таблицы 6, 8 и 13). Кроме того, средние значения MRT составляли $71,7 \pm 13,0$ и $62,8 \pm 8,82$ ч для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней, соответственно, и $68,05 \pm 11,16$ ч для комбинированных 25, 50 и 100 МЕ/кг номинальных доз. (Таблицы 6, 8 и 13.)

[0141] В дополнение к первичным РК параметрам, вторичные РК параметры (например, C168, K-значения, IVR и т.д.) были определены для оценки FIXFc продолжительности эффекта. Как ожидалось, наблюдалось дозозависимое возрастание C168, TBLP1, TBLP3 и TBLP5 значений. Напротив, K-значения и IVR значения, по видимости, были дозозависимыми в оцененном диапазоне доз. В полном дозовом диапазоне модель-прогнозируемые и наблюдаемые K-значения отдельных пациентов находились в диапазоне от 0,61 до 1,02 и от 0,62 до 1,17 МЕ/дл на МЕ/кг, соответственно. Средние модель-прогнозируемые K-значения для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли 0,76 и 0,90 МЕ/дл на МЕ/кг, соответственно, и $0,821 \pm 0,1387$ (диапазон 0,61-1,02) МЕ/дл на 1 МЕ/кг для комбинированных 25, 50 и 100 МЕ/кг номинальных доз. Средние модель-прогнозируемые IVR значения для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли 34,5 и 35,1%, соответственно. Средние наблюдаемые K-значения для 50

и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли 0,86 и 1,02 МЕ/дл на МЕ/кг, соответственно, и $0,926 \pm 0,1787$ (диапазон 0,97-1,17) МЕ/дл на 1 МЕ/кг для комбинированных 25, 50 и 100 МЕ/кг номинальных доз. Средние наблюдаемые IVR значения для 50 и 100 МЕ/кг номинальных дозовых уровней составляли 39,2 и 39,8%, соответственно. (Таблицы 6, 7, 8 и 13.) Таблица 7А-7В показывает вторичные РК суммарные данные активности FIXFc у отдельных пациентов и групповое среднее; сортировано по номинальной дозе, фактической дозе и номеру пациента.

[0142] Каждый 1 МЕ/кг влитого rFIXFc повышал активность FIX в плазме крови на $0,93 \pm 0,18$ МЕ/дл в среднем, и это увеличение концентрации (К значение) показывало слабую положительную корреляцию с весом тела ($R^2=0,336$, $p=0,048$) (Фигура 23).

[0143] Фармакокинетические оценки FIXFc активности согласовывались с оценками rFIXFc антигена (например, сравните Таблицы 13 и 14). Кроме того, наблюдалась превосходная корреляция между активностью rFIXFc и уровнями антигена, показывающая сохранение активности rFIXFc in vivo. (Фигура 9.) Кроме того, по сравнению с накопленными данными по BENEFIX™ (Wyeth), rFIXFc демонстрировал (Таблица 8) следующее:

- Дозовая линейность от 25-100 МЕ/кг
- 3-кратное возрастание $t_{1/2\beta}$
- 3-кратное возрастание среднего времени удержания
- 24% повышенное увеличение концентрации
- в 2,5 раза пониженный клиренс

[0144] FIXFc представляет собой рекомбинантный гибридный белок, состоящий из FIX, прикрепленного к Fc домену человеческого IgG1. FIXFc разработан как версия FIX с продленным действием. Доклинические исследования с FIXFc показали удлинение периода полувыведения активности FIX по сравнению с BENEFIX™, имеющимся в продаже рекомбинантным FIX продуктом. Обоснованием для этого исследования была оценка безопасности и РК FIXFc у пациентов с тяжелой гемофилией В. Для этого исследования 12 подлежащих оценке пациентов в возрасте от 18 до 76 лет подходили для оценки РК. Каждый пациент получил одно введение FIXFc в номинальной дозе 12,5, 25, 50 или 100 МЕ/кг веса тела путем внутривенного вливания в течение примерно 10 минут. Образцы плазмы крови для оценки РК как на активность FIXFc, так и на концентрации антигена, наблюдались перед вливанием, а также на протяжении периода времени до 14 дней после дозирования. РК как FIXFc антигена, так и активности были независимо

охарактеризованы в этом исследовании с использованием модель-зависимых и модель-независимых способов.

- [0145] FIXFc хорошо переносился после введения единичных ВВ доз 12,5; 25; 50 и 100 МЕ/кг веса тела. В этом исследовании не было доказательств серьезных лекарственно зависимых побочных эффектов. Ни у одного пациента не определялись нейтрализующие или связывающие антитела к rFIXFc.
- [0146] Аппроксимированное дозопропорциональное возрастание $C_{\max}$ и AUC_{INF} наблюдалось как для FIXFc антигена, так и для активности после введения доз от 12,5 до 100 МЕ/кг, но V и Cl были одинаковыми при всех дозах. Эти результаты показывают, что FIXFc антиген и активность демонстрировали линейный РК на протяжении оцененного дозового диапазона. Сравнительно маленькие значения V параметра могут показывать, что FIXFc входит во внутритканевую жидкость, но не проникает через клеточную мембрану во внутриклеточные жидкости.
- [0147] Пиковые концентрации в плазме крови FIXFc антигена и активности наблюдались в течение 0,5 ч после окончания вливания и оставались детектируемыми в течение нескольких дней после дозирования. Свидетельства сниженного клиренса и пролонгированного периода полувыведения наблюдались как для FIXFc антигена, так и для активности.
- [0148] Средний клиренс и конечные значения полупериода элиминации, связанные с концентрациями FIXFc антигена в дозовых уровнях 50 и 100 МЕ/кг, составляли 2,28 и 2,11 мл/ч/кг и 110 и 95,8 часов, соответственно. Подобным образом, средний клиренс и конечные значения полупериода элиминации, связанные с уровнями активности FIXFc в том же дозовом диапазоне, составляли 3,77 и 2,89 мл/ч/кг и 52,1 и 52,5 часов, соответственно. Сравнение РК результатов FIXFc активности, наблюдаемых в настоящем исследовании, с сообщенными РК для BENEFIX™ активности (Summary of Product Characteristics of BENEFIX™; 18 ноября, 2009) показало приблизительно 3-кратное уменьшение FIXFc клиренса и приблизительно 3-кратное увеличение как FIXFc полупериода конечной элиминации, так и среднего времени нахождения в организме по сравнению с BENEFIX™.
- [0149] С наблюдаемыми улучшениями РК, FIXFc предоставит пролонгированную защиту от кровотечений, позволяя снизить частоту инъекций индивидуумам с Гемофилией В. Основываясь на результатах этого исследования, rFIXFc может дозироваться каждые две недели или дважды в месяц с использованием доз 100 МЕ/кг и по меньшей мере раз в неделю с использованием более низких доз. Такой режим требует более редких инъекций. Кроме того, использование rFIXFc будет иметь

другие потенциальные клинические влияния, такие как: доступ к центральным венам; улучшенную схему приема лекарства; снижение повреждений из-за кровотечений; и повышенную защиту суставов от кровотечений.

Пример 2. В-ПРОТЯЖЕННАЯ Фаза 1/2/3 исследования

- [0150] Это будет открытое, мультицентровое исследование безопасности, фармакокинетики и эффективности рекомбинантного, долгодействующего коагулянта Фактора IX Fc гибрида (rFIXFc) в профилактике и лечении кровотечения у ранее подвергавшихся лечению пациентов с тяжелой гемофилией В. Лечение FIX продуктами, имеющимися в настоящее время в продаже, требует дозировки 2-3 раза в неделю. Продукт с пролонгированным периодом полувыведения, у которого требуемый интервал дозирования продлен до одного раза в неделю или более, медицинское сообщество сочло бы значимым улучшением в лечении пациентов с тяжелой гемофилией.
- [0151] Дозовые уровни широко варьируют в клинических профилактических исследованиях rFIX продуктов: сообщаемые дозы варьируют от 10 до 171 МЕ/кг (Roth et al., Blood 98:3600 (2001)) или от 40 до 100 МЕ/кг (MASAC Recommendation 177, National Hemophilia Foundation (Oct. 2006)). Кроме того, минимальные уровни FIX активности во время профилактического лечения у пациентов без клинических признаков кровотечения прогнозируются в диапазоне между 0,2 и 3,8 МЕ/дл (Carlsson et al., Hemophilia 4:83 (1998)). Принимая во внимание индивидуальную вариабельность у пациента, индивидуализированные дозовые режимы на основании клинического статуса пациента являются общепринятой практикой.
- [0152] Результаты Фазы 1/2a исследования (Пример 1), оценивающей безопасность и фармакокинетику однократной дозы замороженной липидной лекарственной формы rFIXFc продемонстрировали, что лекарство хорошо переносимо в дозах в диапазоне от 1 до 100 МЕ/кг и характеристика РК подтверждает несколько преимуществ по сравнению с доступными в настоящее время способами лечения, а именно период полувыведения и MRT в 3 раза длиннее, чем те, о которых ранее сообщалось для BENEFIX™ (61 час по сравнению с 19 часами). Целью этого исследования было определить параметр РК дальнейшей оценки лиофилизированного rFIXFc у людей, сравнить его с BENEFIX™ РК параметром оценок у людей, и продемонстрировать эффективность лиофилизированного rFIXFc для предотвращения и лечения кровотечения и безопасности его

повторяющегося дозирования у предварительно подвергавшихся лечению пациентов с тяжелой гемофилией В.

[0153] В исследование вошло четыре группы: низкодозовый профилактический режим лечения (n=25), высокодозовый профилактический режим лечения (n=25), режим лечения по необходимости (n=20) и режим лечения при серьезных хирургических вмешательствах (n=5). Группа низкодозового режима включила РК подгруппу (n=16), получившую дозу BENEFIX™, после чего последовало лечение rFIXFc.

[0154] Первостепенные цели исследования следующие: оценить безопасность и переносимость rFIXFc во всех лечебных группах; оценить эффективность rFIXFc во всех лечебных группах; и оценить эффективность профилактики при терапии по необходимости (сравнение годового числа эпизодов кровотечения между Группами 1 и 2 по отношению к режиму по требованию Группы 3).

[0155] Второстепенные цели исследования следующие: сравнить оценки параметра РК у rFIXFc и BENEFIX™; оценить эффективность rFIXFc в группе лечения по необходимости и хирургической группе; оценить и сравнить оценки параметра РК у rFIXFc базовые и на Неделе 26 (± 1 неделя) в подгруппе РК; оценить реакцию пациентов на лечение во всех группах; и оценить потребление rFIXFc во всех группах.

Основные критерии включения:

Мужской пол, 12 лет и старше, вес по меньшей мере 40 кг
Диагностирована гемофилия В (базовый уровень Фактора IX менее чем или эквивалентен 2%)
В анамнезе по меньшей мере 100 дней воздействия любым продуктом с Фактором IX
Число тромбоцитов ≥ 100000 клеток/мкл
INR (международное нормализованное соотношение) $\leq 1,40$ как определено по тестируемому лабораторному нормальному диапазону
CD4 число ≥ 200 клеток/мкл

Основные критерии исключения:

Ингибиторы Фактора IX в анамнезе
Дисфункция почек или печени
Диагностирован другой дефект коагуляции, отличный от гемофилии В
В анамнезе были случаи анафилаксии, связанной с каким-либо ВВ ведением FIX или иммуноглобулина
Прием системных иммуносупрессорных лекарств (например, системные кортикостероиды; однако, HAART (высокоактивная антиретровирусная терапия) разрешена)

Пример 3. FIXFc производство в HEK293 клетках

- [0156] FIXFc был произведен в стабильно трансфицированных HEK293 клетках, содержащих экспрессионную кассету для FIXFc (нативный FIX, соединенный прямо с Fc участком) и экспрессионную кассету для одного Fc. В клетки также была трансфицирована экспрессионная кассета PC5, которая представляет собой процессирующий энзим, который дает возможность полному процессингу FIX пропептида. Трансфицированные клетки росли в бессывороточной суспензионной среде, содержащей витамин K, и они секретировали три белка: FIXFc димер, FIXFc мономер (одна цепь FIXFc и одна цепь Fc), и Fc димер. FIXFc мономер ("FIXFc") был очищен путем колоночной хроматографии (Белок А, Фрактогель DEAE, и Q Сефароза псевдоаффинное элюирование с низкой ионной силой CaCl_2), и вирус был инактивирован и профильтрован для введения пациентам, являющимся людьми. Также см. Peters et al., Blood. 2010 Mar 11;115(10):2057-64 (Epub 2010 Jan 7); и Патент США No. 7566565; каждый из которых включен в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.
- [0157] Коагулирующая активность FIXFc была оценена путем подсчета его способности восстанавливать активность свертывания дефицитной по FIX плазмы крови с использованием MLA Electra 1600C (Medical Laboratory Automation/Instrument Labs, Pleasantville, NY). Результаты сравнивались с калибровочной кривой, сгенерированной с использованием серийных разведений FIX стандарта Всемирной Организации Здравоохранения.
- [0158] Предполагают, что фосфорилирование серина и сульфатация тирозина Фактора IX важны для возрастания концентрации *in vivo*. Сообщалось, что MONONINE™ (очищенный из плазмы Фактор IX (pdFIX), продающийся CSL Berhing) обладает лучшим возрастанием концентрации *in vivo*, чем BENEFIX™ (рекомбинантный FIX (rFIX), продающийся Wyeth) из-за более высокого уровня фосфорилирования/сульфатации MONONINE™ (>90%/>90% в сравнении с <10%/5%). Однако FIXFc, вырабатываемый в HEK293 клетках, почти не имеет фосфорилирования/сульфатации (<10%/4%, что очень сходно с BENEFIX™), и показывает лучший IVR (1.0 МЕ/дл на МЕ/кг), чем BENEFIX™ (0,7).
- [0159] Кроме того, FIXFc, произведенный, как описано выше, имел значительно более низкий (в 10-100 раз) уровень (0,01-0,001%) активированного FIX (FIXa), связанной с продуктом примеси, чем MONONINE™ (pdFIX) или BENEFIX™ (rFIX) (0,1%). Получившийся в результате FIXFc будет реже давать

нежелательные случаи тромбообразования после введения, чем MONONINE™ или BENEFIX™.

Пример 4. Педиатрические исследования: экстраполяция и взаимосвязь между разработкой у взрослой и педиатрической выборки

- [0160] Характеристики пациентов, которые показывают взаимосвязь с FIX фармакокинетикой, включают возраст-зависимые физиологические изменения (Björkman and Berntorp, Clin. Pharmacokinetics 40:815-32 (2001); and Bjorkman, Hemophilia 9(suppl 1):101-10 (2003)) и размер и сложение тела (Shapiro, Hemophilia 11:571-82 (2005)). Таким образом, обычно обнаруживалось, что приведенный в соответствие с весом клиренс (CL) FIX уменьшается с возрастом и и/или весом тела во время роста от младенческого периода к взрослому состоянию, с соответствующим повышением терминального полупериода ($t_{1/2}$). Для rFIX продукта (BENEFIX™) CL и объем распределения в стационарной фазе (V_{ss}) возрастают у детей и затем остаются постоянными во взрослом состоянии; таким образом, эти параметры будут тщательно мониториться в педиатрических исследованиях.
- [0161] Пиковые уровни FIX прокагулянтной активности (FIX:C) зависят от первичного объема распределения FIX:C после однократных и/или повторных доз FIX. Первоначальное распределение FIX быстрое. Однако показано, что *in vivo* возрастание концентрации (среднее нарастающее возрастание концентрации) для BENEFIX™ было обычно на 30% ниже, чем у фактора коагуляции, полученного из плазмы и очищенного моноклональным антителом (pdFIX) (Roth et al., Blood 98:3600-3606 (2001)). Кроме того, исследования с pdFIX показали, что пациенты в возрасте 15 лет и моложе имеют значительно более низкое возрастание концентрации, чем пациенты более старшего возраста (White et al., Thromb. Haemost. 73:779-84 (1995)). Поэтому в педиатрических исследованиях будет также проводиться мониторинг минимальных и пиковых уровней.
- [0162] Поскольку исследования показали, что дети могут реагировать по-другому по сравнению со взрослыми, фармакокинетические оценки при базовом уровне 50 МЕ/кг rFIXFc будут проведены на детях с сокращенным фармакокинетическим взятием проб.
- [0163] Фаза 1/2a исследования (SYN-FIXFc-07-001), оценивающая безопасность и фармакокинетический профиль однократного внутривенного введения rFIXFc в RTPs в возрасте 18 лет и старше с серьезной гемофилией В, была завершена

недавно. Предварительные результаты этого первичного исследования на людях демонстрируют приблизительно 3-кратное повышение фармакокинетических параметров (средний терминальный полупериод, MRT и AUC) rFIXFc в сравнении с тем, что сообщалось в литературе для BENEFIX™ (см. выше). Кроме того, rFIXFc хорошо переносился и не было признаков реакций в месте инъекции, а также не вырабатывались ингибиторы. Взятые вместе, эти результаты по безопасности и фармакокинетике говорят в пользу начала Фазы 1/2/3 регистрационного исследования (998NB102 Исследование (B-LONG), см. выше), оценивающего безопасность, фармакокинетику и эффективность rFIXFc в предотвращении и лечении кровотечения у 104 PTPs (с по меньшей мере 100 лечебных EDs предыдущих продуктов) 12 лет и старше с тяжелой гемофилией В (<2%). Когда достаточное количество данных по безопасности будет доступно после регистрационного исследования, будет начата педиатрическая программа для дальнейшего исследования безопасности и эффективности rFIXFc у детей. Демонстрация пролонгированного полупериода rFIX у взрослых будет означать, что для профилактики и лечения кровотечений у индивидуумов с гемофилией В будут требоваться более редкие инъекции.

Фаза 2/3 Педиатрическое PTPs исследование ранее подвергавшихся лечению детей (возраст < 12 лет)

[0164] Когда будут доступны данные по 10 PTPs (≥ 12 лет) для 26 EDs из регистрационного исследования (Исследование 998NB 102), будет начато Педиатрическое Исследование, фаза 3. Эта Фаза 2/3 педиатрического исследования, относительно PTPs, которые имели по меньшей мере 50 EDs к FIX продуктам до включения в исследование, будет проведена глобально примерно по 25 клиническим сайтам. Приблизительно 25 PTPs (для того чтобы гарантировать 20 подходящих для оценки пациентов), в возрасте 2-11 лет с тяжелой гемофилией В (<2 ME/дл [$<2\%$] эндогенный FIX), будут скринированы и отобраны в соответствии с определенными заранее критериями. Все получившие оценку пациенты войдут в фармакокинетическую часть исследования (РК с предисследуемым FIX продуктом и затем РК с rFIXFc) и будут получать еженедельно дозу rFIXFc на протяжении 52 недель. В этом исследовании будет фиксироваться постепенное повышение концентрации, период полувыведения *in vivo*, AUC, и клиренс rFIXFc. Все пациенты подвергнутся фармакокинетической оценке базового уровня с FIX и rFIXFc перед исследованием, и продолжительность исследования для каждого

пациента будет приблизительно составлять 69 недель, включая скрининг и последующее наблюдение.

[0165] Каждый пациент получит 50 МЕ/кг rFIXFc при первом визите для фармакокинетической оценки, после чего последуют повторяющиеся еженедельные дозы 50-60 МЕ/кг rFIXFc. С учетом соблюдения режима пациентом, фармакокинетические пробы для пред-исследования продукта и для rFIXFc будут браться по сокращенной программе, а именно: перед дозой, конец инъекции, 30 + 10 минут, 3 ± 1 часа, 24 ± 3 (День 1), 72 ± 3 (День 3), 120 ± 3 (День 5) и 168 ± 3 часа (День 7) после окончания инъекции. Для того чтобы исследовать иммуногенность, все пациенты получают rFIXFc еженедельно минимум 50 EDs. Параметры безопасности будут включены для немедленной оценки безопасности и переносимости, такие как: (а) основные показатели состояния организма (пульс, давление крови, частота дыхания, температура) перед инъекцией rFIXFc и через 30 минут после инъекции; (b) параметры гематологии и коагуляции; (с) клиническая химия; (d) частые определения FIX ингибитора с использованием модифицированного по Неймегену Бетезда-анализа (непосредственно перед первым воздействием, ED4 [Неделя 4], ED12, ED24, ED36 и ED50); и (е) нежелательные явления.

[0166] Эффективность будет оцениваться по оценке числа эпизодов кровотечения, интервалов между кровотечениями и числу лечений и потребления FIX в оцениваемый год и на случай, требующий лечения.
Фаза 2/3 Педиатрическое PUPs исследование ранее не получавших лечение детей (возраст 0-11 лет)

[0167] Когда данные по 10 ранее получившим лечение детям (2-11 лет) с полной фармакокинетикой и 50 EDs будут доступны в предшествующем исследовании, будет начата Фаза 2/3 педиатрического PUPs исследования. Это исследование будет проведено глобально примерно на 60 клинических сайтах. До 30 PUPs (для обеспечения 20 пригодных для оценки пациентов) в возрасте 0 лет и старше с серьезной гемофилией В (<2 МЕ/дл [$<2\%$] эндогенный FIX) будут скринированы и отобраны в соответствии с предварительно определенными критериями.

[0168] Участие в исследовании будет варьировать, поскольку при начале лечения может использоваться rFIXFc как модифицированный профилактический режим. Ожидается, что участие пациента в исследовании будет продолжаться примерно четыре года, включая скрининг и наблюдение за отдаленными результатами. Ожидается, что в течение этого времени большинство пациентов достигнут 50 EDs

до rFIXFc. Для того чтобы исследовать иммуногенность, все пациенты будут подвергнуты лечению приблизительно 50 EDs rFIXFc или в течение периода времени до 4 лет. Параметры безопасности будут включены для немедленной оценки безопасности и переносимости: (а) частые определения FIX ингибитора с использованием модифицированного по Неймегену Бетезда-анализа; и (b) нежелательные явления.

[0169] Эффективность будет оцениваться по оценке числа эпизодов кровотечения, интервалов между кровотечениями и числа лечений и потребления FIX на анализируемый год и на случай, требующий лечения.

Пример 5. Биохимическая характеристика, активность и анализ РК у животных, не являющихся человеком

[0170] rFIXFc, произведенный в Примере 3, был охарактеризован по своей посттрансляционной модификации, и были получены следующие результаты (см. Таблицу 15 и Фигуру 11). Пропептид rFIXFc был должным образом процессирован во время производства. Паттерн rFIXFc's гамма-карбоксилирования был подобен паттерну rFIX. Кроме того, общее Gla/молекула ($11,2 \pm 0,7$) rFIXFc было сравнимо с rFIX. Поскольку гамма-карбоксилирование определенных остатков необходимо для активности FIX, эти результаты являются важными. Кроме того, Ser 158 фосфорилирование и Tug 155 сульфатирование rFIXFc были сравнимы с rFIX. N-связанные гликаны в FIX не полностью сиалированы, так же как у rFIX. rFIXFc O-связанное гликозилирование первого EGF домена было таким же, как у FIX, хотя и в различных сравнительных соотношениях. Asp 64 из rFIXFc имел более высокую степень бета-гидроксилирования, чем rFIX или полученный из плазмы FIX (pdFIX). Активированный FIX присутствовал в намного более низкой концентрации в препарате rFIXFc, чем в rFIX или pdFIX препаратах, как описано детально в Примере 3.

[0171] Кроме того, rFIXFc был введен различным видам животных для определения его активности и параметров РК. Результаты показаны в Таблице 16 и на Фигурах 12-16.

Пример 6. Гамма-карбоксилирование

[0172] Целями этого исследования было проанализировать и охарактеризовать γ -карбоксилирование глутаминовых кислот (Gla) в доклинической партии FIXFc материала и имеющихся в продаже FIX продуктах, охарактеризовать содержание

Gla в обогащенной «пиковой» фракции и высокосолевого элюирования «стрип» фракции, первоначально полученной на этапе псевдоаффинной ион-обменной хроматографии, и в дальнейшем разделить на обогащенную «пиковую» и на высокосолевого элюирования «стрип» фракцию путем анион-обменной ВЭЖХ, а затем охарактеризовать различные образцы.

[0173] Для достижения этих целей, было разработано множество дополнительных аналитических способов. Они включают аминокислотный анализ (AAA) с использованием щелочного гидролиза для определения (общего) содержания Gla, пептидную карту (LC/MS) с использованием Lys-C пептидов для определения распределения Gla, аналитическую анионообменную ВЭЖХ интактных молекул для разделения изоформ, и активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT) для определения биологической активности.

[0174] Два Gla (E) содержащих пептида представляют собой:

–K1K2: YNSGKL⁷E⁸EFVQGNL¹⁵ER¹⁷ECM²⁰E²¹EK

•[M+H]⁺+6 Gla = 2953,9

•[M+H]⁺+5 Gla = 2909,9

–K3: CSF²⁶E²⁷EAR³⁰EVF³³ENT³⁶ERTT⁴⁰EFWK

•[M+H]⁺+6 Gla = 2959,9

•[M+H]⁺+5 Gla = 2915,9

•[M+H]⁺+4 Gla = 2871,9

[0175] Тридцать микрограмм образца (полученного из обогащенной пиковой фракции, высокосолевого стрип-фракции, и каждый образец из аналитической анионообменной ВЭЖХ) был денатурирован, восстановлен, алкилирован и обработан Lys-C (1:20, E:S). Реакция была остановлена 2% TFA, и обработанный продукт был введен в Jupiter C18 (2,0 x 250 мм) Phenomenex колонку. Разделение было осуществлено Agilent 1100 системой. Колонка была установлена на 25° C и пептиды были элюированы по многоступенчатому ацетоннитриловому градиенту. Масс-спектрометрия (Thermo-Fisher LCQ) была проведена по “Triple Play” способу.

[0176] Для анализа и характеристики содержания Gla и распределения доклинического rFIXFc материала были разработаны дополнительные способы. γ-карбоксилирование доли глутаминовых кислот (Gla) и распределение доклинической партии rFIXFc (обогащенная пиковая фракция) было проведено и сравнено с имеющимися в продаже продуктами. Анализ продемонстрировал такое же содержание и распределение Gla, как и у имеющихся в продаже продуктов. Высокосолевого элюирования «стрип» фракция была проанализирована и сравнена

с обогащенной пиковой фракцией. Анализ показал пониженный уровень γ -карбоксилирования.

[0177] FIXFc (Обогащенная Пиковая Фракция) была выделена на ион-обменном этапе псевдоаффинной хроматографии и затем разделена на 3 изоформы путем аналитической анионообменной ВЭЖХ. Загруженные в AEX колонку и разделенные образцы были высоко γ -карбоксилированы. (Загрузка AEX колонки представляет собой стрип фракцию, собранную во время этапа высокосолевого элюирования из этапа псевдоаффинной ион-обменной хроматографии.) Загруженные в AEX колонку и разделенные образцы были биологически активными. Содержание и распределение Gla было подобно rFIX. Пептидная карта показала распределение 4/5/6 Gla's у K3 пептида. Пептидная карта показывает высокое количество 6 Gla's в K1K2 пептиде и следовые количества 5 Gla's.

[0178] FIXFc (Стрип Пиковая Фракция) была выделена на ионообменном этапе псевдоаффинной хроматографии и затем разделена на 2 изоформы путем аналитической анионообменной ВЭЖХ. Загруженные в AEX колонку и разделенные образцы имели сниженный уровень γ -карбоксилирования. Наблюдалось уменьшенное содержание Gla по сравнению с обогащенной FIXFc пиковой фракцией. Наблюдался пониженный уровень биологической активности. Пептидная карта показывает повышенное количество 5 Gla's в K1K2 по сравнению с обогащенной пиковой фракцией, что может подтверждать влияние биологической активности.

[0179] Ссылки (каждая из которых включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки): Dumont JA, et al., Monomeric Fc Fusion Molecules in Therapeutic Abs-From Bench to Clinic, Ch. 33 p779-795; Gillis S, et al., Protein Science (1997) 6:185; White GC, et al., J. Thrombosis and Haemostasis (1997) 78:261; Hansson K, and Stenflo J, Journal Thrombosis and Haemostasis (2005) 3:2633; and Peters RT, et al., Blood (2010) 115:2057.

Пример 7. Оценка rFIXFc про-коагулянтной активности в моделях кровотечений у HemB мышей

Сравнительный потенциал rFIXFc и BENEFIX™ был продемонстрирован у HemB мышей по анализу цельной крови ROTEM *in vitro* и у HemB мышей модели кровотечения при отсечении хвоста *in vivo*.

[0180] Способность rFIXFc формировать прочные и стабильные сгустки была оценена по Ротационной Тромбоэластометрии (ROTEM®, Pentapharm GmbH, Munich, Germany)

с хлоридом кальция как активатором (NATEM). Совокупная цельная кровь, собранная из поллой вены HemB мышей, была разделена на семь аликвот, в которые был впрыснут rFIXFc до конечной концентрации 7,4%, 0,74% и 0,074% нормальной плазматической FIX активности, или BENEFIX™ до 10%, 1%, 0,1% от нормы. В качестве негативного контроля, в пробу крови был впрыснут буфер FIX состава. Пулы общим числом 10 от 5 HemB мышей были созданы для завершения исследования. Реакция NATEM была инициирована добавлением CaCl_2 . Исследовались параметры коагуляции, включая Время Свертывания (СТ), Время Формирования Сгустков (CFT) и Альфа Угол. Среднее и SD от СТ, CFT и альфа угол суммированы в Таблице 17. Дозовые ответы для трех параметров нанесены на график на Фигуре 17. Все три параметра сравнивались между rFIXFc и BENEFIX™ в тестируемом дозовом диапазоне ($p > 0,05$ по однофакторному ANOVA (Крускал-Уоллис) анализу).

[0181] Эффективность в неотложном случае rFIXFc была также оценена в модели кровотечения при отсечении хвоста у HemB мышей. (Фигура 18.) Самцы HemB мышей были стратифицированы для эквивалентной презентации веса тела и возраста в различных экспериментальных группах. Перед отсечением хвоста мыши были анестезированы смесью 50мг/кг Кетамина и 0,5 мг/кг Дексметомидина и помещены на подогреваемую подушку для поддержания температуры тела. Хвосты мышей были затем погружены в 37°C воду на 10 минут для расширения латеральной вены. После расширения латеральной вены rFIXFc, BENEFIX™ или раствор-наполнитель были введены путем инъекции в хвостовую вену и через 5 минут дистальные 4 мм хвоста были отсечены с использованием #11 скальпеля с прямым лезвием. Изливавшаяся кровь собиралась в 13 мл теплого солевого раствора в течение 30 минут и потеря крови была подсчитана гравиметрически. Тестировались шесть rFIXFc экспериментальных групп (720, 360, 240, 120, 80, 40 МЕ/кг, $n=15$) и три BENEFIX™ экспериментальные группы (360, 120, 40 МЕ/кг, $n=15$). Объем потери крови отдельного животного и кривая дозового ответа медианной потери крови показаны на Фигуре 19(A), и медианный объем потери крови каждой экспериментальной группы суммирован в Таблице 18. Дозовые ответы по медианному объему потери крови для rFIXFc и BENEFIX™ сравнимы ($p = 0,9315$ по непарному t критерию с коррекцией Уэлча).

[0182] Для определения того, является ли трехкратное увеличение продолжительности периода полувыведения rFIXFc по сравнению с BENEFIX™ результатом пролонгированной эффективности rFIXFc, изобретатели настоящего изобретения

оценили эффективность rFIXFc и BENEFIX™ как в ex-vivo ROTEM® анализе, так и в модели кровотечения при рассечении хвостовой вены (TVT) у HemB мышей. Фигура 20.

[0183] Для ex vivo ROTEM®, самцы HemB мышей получили 50 МЕ/кг rFIXFc или 100 МЕ/кг BENEFIX™ путем внутривенной инъекции. Цельная кровь была собрана из полых вен обработанных животных на 5 мин, 24, 72, 96, 120, 168 и 216 часах после rFIXFc дозирования (n=8 мышей на каждую временную точку) или на 5 мин, 24, 48, 72 и 96 часах после BENEFIX™ дозирования (n=4 мыши/временная точка). Пробы крови анализировались с помощью NATEM. Среднее и SD для CT, CFT и альфа угол показаны в Таблице 19, и CT, CFT и альфа угол по сравнению с временными кривыми показаны на Фигуре 21. В сравнении с BENEFIX™, rFIXFc показал сравнимый CT, CFT и альфа угол на 5 мин, но достоверно повышенный CT, CFT и альфа угол после 72 ч несмотря на дозу в 2 раза ниже по сравнению с BENEFIX™.

[0184] Для оценки профилактической эффективности rFIXFc и BENEFIX™, самцы HemB мышей были стратифицированы для эквивалентной репрезентации веса тела и возраста в 9 различных опытных группах. rFIXFc был введен путем вв инъекции в дозе 4 МЕ/кг, 13 МЕ/кг, 40 МЕ/кг и 120 МЕ/кг на 72 часах перед рассечением хвостовой вены, тогда как те же дозы BENEFIX™ были введены на 24 часах перед травмой. Перед рассечением хвостовой вены мыши были анестезированы смесью 50 мг/кг Кетамин/0,125 мг/кг Дексметомидин/ 0,1 мг/кг Бупренекс. Для того чтобы дать возможность мышам поддерживать нормальную активность после рассечения хвостовой вены, 1 мг/кг раствора Атипамезола было дано для того чтобы обратить действие Дексметомидина, за чем немедленно последовало рассечение латеральной хвостовой вены хирургическим скальпелем номер 11 с плоским лезвием в области, где диаметр хвоста приблизительно равняется 3 мм. Льющаяся кровь смывалась теплым солевым раствором для обеспечения четкой видимости раны, и мышь была затем помещена отдельно в чистую клетку с белой бумажной подкладкой на следующие 24 часа. Остановка кровотечения и физическая активность наблюдались и фиксировались ежедневно в течении периода времени до 12 часов после травмы. Умиравшие мыши были немедленно подвергнуты эвтаназии после идентификации, и полный осмотр для завершения исследования был проведен через 24 часа после травмы. Кривая Каплана-Мейера для времени эвтаназии и карта степеней выживаемости через 24 часа после TVT показаны на Фигуре 22. Логарифмический ранговый критерий определил, что все

экспериментальные группы с дозой выше чем 4 МЕ/кг достоверно лучше, чем группа, обработанная раствором-наполнителем ($p < 0,001$). Кроме того, выживаемость сравнивалась между мышами, которые получили одинаковую дозу rFIXFc на 72 ч перед травмой и BENEFIX™ на 24 ч перед травмой ($p = 0,4886$; $0,9268$; $0,7279$ и $0,5209$ для 4, 13, 40 и 120 МЕ/кг дозовых групп соответственно). Степени выживаемости на 24 часах после TVT были нанесены на график и ED50 значение для каждой молекулы было экстраполировано из кривой, ED50 для двух обработок одинаковы при 17,8 МЕ/кг для rFIXFc и 15,4 МЕ/кг для rFIX. Следовательно, rFIXFc предоставлял в 3 раза большую продолжительность защиты у HemB мышей по сравнению со сравнимой дозой BENEFIX™, как оценивалось по выживаемости и повторному кровотечению после травмы рассечения хвостовой вены. Следовательно, rFIXFc предоставлял в 3 раза большую продолжительность защиты у HemB мышей по сравнению со сравнимой дозой BENEFIX™, как оценивалось по выживаемости и повторному кровотечению после травмы рассечения хвостовой вены.

[0185] В заключение, как показывают данные, несмотря на то, что 15,4 МЕ/кг BENEFIX™ приводило к 50% выживаемости HemB мышей при рассечении хвостовой вены на 24 ч после дозирования, 50% выживаемости у животных, получивших 17,8 МЕ/кг rFIXFc было достигнуто при травме на 72 ч после дозирования. Следовательно, rFIXFc демонстрирует в 3 раза более длительную профилактическую эффективность в корреляции с продлением его периода полувыведения в сравнении с BENEFIX™. Результаты мо моделям кровотечения в дальнейшем были подтверждены *ex vivo* ROTEM® анализом цельной крови из HemB мышей, обработанных или 100 МЕ/кг BENEFIX™, или 50 МЕ/кг rFIXFc. На 5 мин после дозирования, сравнимые улучшения в образовании сгустка наблюдались в обеих экспериментальных группах. Однако большинство ROTEM® параметров, таких как время свертывания, время образования сгустка и альфа-угол были достоверно лучше у rFIXFc-обработанных мышей от 72 до 216 ч после дозирования, несмотря на в 2 раза более низкую дозу rFIXFc по сравнению с BENEFIX™.

[0186] Подводя итог, потенциал rFIXFc в неотложном случае сравним с таковым у BENEFIX™, как показано и на ROTEM® цельной крови *in vitro*, и на модели кровотечения при отсечении хвоста у HemB мышей. Пролонгированная профилактическая эффективность rFIXFc была показана на *ex vivo* ROTEM® цельной крови у обработанных HemB мышей и была определена как

приблизительно в 3 раза более длинная в сравнении с BENEFIX™ в модели кровотечения при рассечении хвостовой вены у HemB мышей. Пролонгированная эффективность rFIXFc хорошо коррелирует с в 3 раза более длинным $T_{1/2}$ rFIXFc по сравнению с BENEFIX™, ранее демонстрировавшимся в фармакокинетическом исследовании у HemB мышей. Следовательно, rFIXFc полностью активен для лечения по требованию, поскольку достигается достоверно пролонгированная профилактическая защита с потенциалом уменьшения частоты дозирования, что является объектом изучения в фазе 3 исследования.

Пример 8. Анализ фармакокинетики и фармакодинамики rFIXFc и BENEFIX™ после однократной подкожной дозы дефицитным по FIX мышам

- [0187] Фармакокинетические (PK) и фармакодинамические (PD) профили рекомбинантного Фактора IX-Fc (rFIXFc) и BENEFIX™ (rFIX) были определены после однократной внутривенной или подкожной инъекции 200 или 400 МЕ/кг у дефицитных по FIX мышей. Цельная кровь была собрана из поллой вены (n=4 мыши/временная точка/обработка). Концентрации rFIXFc и BENEFIX™ в плазме крови были определены с использованием специфичного на человеческий FIX анализа ИФА. Активность rFIXFc и BENEFIX™ определялась с использованием анализа активированного частичного времени тромбопластина. PK анализы были проведены с использованием модель-зависимой методологии, использующей WinNonLin. Результаты показаны в Таблицах 22 и 23.
- [0188] Для FIXFc, биодоступность у дефицитных по FIX мышей составляла 38% для дозы 200 МЕ/кг и 38-46% для комбинированной дозы (антиген ИФА) и 29% для дозы 200 МЕ/кг и 29-39% для комбинированной дозы (исследование aPTT активности) по сравнению с rFIX, 23% и 19%, соответственно. rFIXFc имел в 1,5-1,7 раза (доза 200 МЕ/кг) и в 1,5-2,5 раза (комбинированные дозы) повышенную биодоступность по сравнению с BENEFIX™.
- [0189] Для rFIXFc терминальный полупериод (антиген ИФА) составлял 62 ч для дозы 200 МЕ/кг и 51-62 ч для комбинированных доз и терминальный полупериод (исследование aPTT активности) составлял 42 ч для дозы 200 МЕ/кг и 40-42 ч для комбинированных доз, тогда как для BENEFIX™ терминальный полупериод составлял 24 ч (антиген ИФА) для дозы 200 МЕ/кг и 17 ч (исследование aPTT активности) для дозы 200 МЕ/кг. Это указывает на 2,5-2,6 кратное (доза 200 МЕ/кг и комбинированная доза) повышение полупериода с rFIXFc.

- [0190] Кроме того, как показано в Таблицах 22 и 23, rFIXFc имел 4,5-5,6 кратное возрастание AUC/доза и 1,9-3,7 кратное возрастание C_{max}/доза по сравнению с BENEFIX™.
- [0191] Рекомбинантный фактор IX Fc гибридный (rFIXFc) белок является долгодействующей формой рекомбинантного FIX (rFIX), что даст возможность менее частого дозирования rFIX при лечении гемофилии В. У мышей и нечеловекообразных приматов и пациентов с гемофилией В rFIXFc имеет приблизительно в 3 раза более длинный период полувыведения по сравнению с rFIX (BENEFIX™). Для профилактического лечения внутривенное введение rFIX остается сложным способом доставки, особенно у детей и пациентов с трудно доступными венами. Подкожное введение rFIX представляется более привлекательным путем доставки, менее травматичным и с менее частым дозированием. Таким образом, подкожное введение rFIXFc причинит меньше боли и дискомфорта чем внутривенное введение, и приведет к улучшенному соблюдению режима лечения, поскольку введение более легкое и занимает меньше времени, чем в случае внутривенного введения. Профилактический режим также улучшит качество жизни, и клинические последствия будут включать сниженные случаи кровотечения.
- [0192] Концентрация rFIXFc в плазме мышей была подсчитана с использованием FIX-специфичного человеческого ИФА, по которому оценивалась FIX часть молекулы и мг/кг номинальная доза использовалась в анализе. Суммарные PK параметры для rFIXFc и BENEFIX™ показаны в Таблице 20 (антиген ИФА) и Таблице 21 (исследование активности aPTT) для n=4/группа. Оба анализа антигена и активности показали, что C_{max} и AUC в случае rFIXFc были достоверно улучшены по сравнению с BENEFIX™. При использовании антигена ИФА, биодоступность (F %) составляла 38% для rFIXFc по сравнению с 23% для BENEFIX™. Подобным образом, при использовании исследования активности aPTT биодоступность составляла 29% для rFIXFc по сравнению с 19% для BENEFIX™. Таким образом, rFIXFc по сравнению с BENEFIX™ демонстрировал повышение биодоступности в 1,5-1,6 раза. Оценки полупериода элиминации показали, что rFIXFc заметно повышал полупериод, как было подсчитано по анализам антигена (rFIXFc 62 ч по сравнению с BENEFIX™ 24 ч) или активности (rFIXFc 42 ч по сравнению с BENEFIX™ 17 ч). Эти данные показывают, что rFIXFc имел полупериод, удлинённый по сравнению с BENEFIX™ в 2,6-2,5 раза.

[0193] rFIXFc, даваемый подкожно дефицитным по FIX мышам, демонстрировал PK и PD профиль с возрастаниями в C_{max} и AUC для rFIXFc по сравнению с BENEFIX™. В целом, биодоступность для rFIXFc находилась в диапазоне от 29% (активность) до 38% (антиген) с полупериодом от 42 ч (активность) до 62 ч (антиген) по сравнению с BENEFIX™, который имел биодоступность от 19-23% и полупериод от 17-24%, соответственно. Таким образом, полупериод для rFIXFc, введенного подкожно дефицитным по FIX мышам, продемонстрировал возрастание в от около 2,2 (антиген) раза до 3,3 (активность) раза по сравнению с имеющимися в продаже rFIX продуктами, даваемыми внутривенно. В целом, эти данные подтверждают, что замечание, что rFIXFc, доставляемый подкожно, будет иметь клиническое преимущество для профилактического лечения пациентов с гемофилией В.

Пример 9. Фармакокинетический анализ rFIXFc после однократной подкожной дозы яванским макакам

[0194] Фармакокинетический профиль (PK) рекомбинантного Фактора IX-Fc (rFIXFc) был исследован после однократной подкожной дозы 50 МЕ/кг, 100 МЕ/кг или 200 МЕ/кг яванским макакам. Концентрация rFIXFc в плазме крови была подсчитана с использованием FIX-специфичного ИФА. Первичный анализ был проведен с использованием модель-зависимой методологии с использованием WinNonLin. См. Таблицы 22-25.

[0195] Фармакокинетический анализ концентрации в плазме по сравнению с временными данными (подсчитан по FIX-специфичной ИФА) продемонстрировал, что биодоступность и терминальный полупериод были одинаковыми при различных дозах. Биодоступность rFIXFc составляла 40% (50 МЕ/кг), 34% (100 МЕ/кг), 36% (200 МЕ/кг) и 36-45% (комбинированные дозы). Терминальные полупериоды для rFIXFc составляли 61 ч (50 МЕ/кг), 45 ч (100 МЕ/кг), 49 ч (200 МЕ/кг) и 44-58 ч (комбинированные дозы).

[0196] Концентрация rFIXFc в плазме крови обезьян была подсчитана с использованием FIX-специфичного ИФА, который измерял FIX часть молекулы, и мг/кг номинальная доза была использована в анализе. Анализы выброса и повышения концентрации продемонстрировали точность этого FIX-специфичного ИФА анализа для детекции rFIXFc в диапазоне оцениваемых плазматических концентраций. Сводки PK параметров для rFIXFc показаны в Таблице 22 (50 МЕ/кг), Таблице 23 (100 МЕ/кг) и Таблице 24 (200 МЕ/кг) для n=3/группа. Для rFIXFc SC геометрические средние и CV% геометрического среднего для C_{max}

составляли $860 + 22$ (50 МЕ/кг), $1630 + 97$ (100 МЕ/кг) и $3,750 + 26$ (200 МЕ/кг), соответственно указывая на дозозависимое возрастание. Подобные возрастания наблюдались для AUC. Геометрические средние для биодоступности (F %) составляли $40 + 16$ (50 МЕ/кг), $30 + 75$ (100 МЕ/кг) и $36 + 27$ (200 МЕ/кг), демонстрируя, что биодоступность была одинакова при разных дозах. Измерения терминального полупериода показали, что полупериод был одинаков в диапазоне доз $58 + 39$ ч (50 МЕ/кг), $45 + 13$ ч (100 МЕ/кг) и $46 + 44$ ч (200 МЕ/кг).

[0197] rFIXFc, даваемый подкожно яванским макакам, демонстрировал РК профиль с дозозависимым возрастанием C_{max} и AUC. В целом, биоактивность находилась в диапазоне 30-40% с полупериодом 45-58 ч. Таким образом, полупериод для rFIXFc, введенного подкожно макакам, демонстрировал примерно 2,8-кратное возрастание по сравнению с имеющимися в продаже rFIX продуктами, даваемыми внутривенно. В целом, эти данные поддерживают представление, что rFIXFc, вводимый подкожно, будет иметь клиническое преимущество для профилактического лечения пациентов с гемофилией В.

Пример 10. Рекомендуются профилактические дозовые режимы

[0198] По сравнению со стандартными рекомендованными дозовыми режимами от 25 до 40 МЕ/кг FIX дважды или три раза в неделю, медианная rFIXFc активность РК, полученная в ходе Фазы 1/2а исследования, описанного выше, подтверждает, что дозирование rFIXFc около одного раза в неделю около 22,5 МЕ/кг, или примерно каждые 10 дней около 45 МЕ/кг, или примерно каждые 2 недели около 120 МЕ/кг достаточно для поддержания минимального уровня 1% выше базового уровня (Фигура 24). Эти модель-симулированные оценки валидированы по доступным данным из Фазы 1/2а исследования, которое полностью попадает в 95% доверительный интервал моделированной кривой «активность по отношению ко времени». Эти режимы часто будут служить для начала терапии. Принимая во внимание гетерогенность сообщаемых клинических случаев прорывного кровотечения по отношению к минимальному уровню плазматической FIX активности, поддерживающие дозы необходимо будет рассчитывать индивидуально.

[0199] После перерасчета РК результатов Фазы 1/2 исследования (см. Пример 11), новый расчетный дозовый режим, например, для профилактики, составляет 20 МЕ/кг один раз в неделю, 40 МЕ/кг каждые 10 дней или 100 МЕ/кг каждые две недели (два раза в месяц). См. также Таблицу 27 и Фигуру 25.

Пример 11. Перерасчет фармакокинетических данных впервые проведенного на человеке (FiH) исследования (Пример 1)

- [0200] Пациенты с различными генотипами гемофилии В, такими как стоп кодон/нонсенс и мисенс-мутациями, были включены в FiH исследование, обсуждаемое в Примере 1. Несколько пациентов имели заметно сниженные эндогенные уровни FIX антигена, что коррелировало с заметно сниженной FIX активностью, тогда как у нескольких пациентов с миссенс-генотипами было больше антигена, чем подсчитанной активности, что указывает на дисфункциональный циркулирующий белок. FIX активность до лечения у 2 пациентов превышала 2 МЕ/дл, вероятно, вследствие неполного вымывания после последнего вливания FIX концентрата на основе тестирования в анамнезе и фенотипа болезни. Основываясь на этой информации, PK данные из Примера 1 были перерасчитаны без вычитания базового уровня, как детально описано ниже. См. Таблицу 27.
- [0201] В отличие от PK расчетов (на основании активности) в Примере 1, если rFIXFc активность PK моделировалась без вычитания базового уровня, как недавно сообщалось для PK анализа гликопегилированного rFIX (Negrier et al., *Blood* DOI 10.1182/blood.2011.02.335596 (2011), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки), получившиеся в результате оценки полупериода элиминации и MRT намного длиннее, чем оценки в Примере 1, на $82,2 \pm 21,6$ и $96,8 \pm 22,0$ часах (среднее $\pm$ SD), соответственно. Однако, зная, что не все пациенты с тяжелой гемофилией В имеют 0% эндогенной FIX активности, и принимая во внимание генотип пациента и эндогенный уровень FIX антигена, изобретатели настоящего изобретения адаптировали способ анализа с вычитанием базового уровня в своем PK моделировании. Более точно, (a) базовый уровень у двух пациентов был определен как 0%, поскольку их FIX активность перед лечением составляла $<1\%$, они не имели определяемого FIX антигена и имели нонсенс-генотипы, (b) базовый уровень у трех пациентов был установлен как 0,5%, поскольку их FIX активность перед лечением была $<1\%$ и они имели детектируемый FIX антиген, (c) для пациентов, чья FIX активность перед лечением была между 1 – 2%, C_{min} (самая низкая активность в ходе PK исследования) определялась как базовый уровень, и (d) для пациентов, чья FIX активность перед лечением была $\geq 2\%$, 2% (что было выше пограничного значения для вхождения в исследование) было базовым уровнем. Активность выше базового уровня перед дозой рассматривалась как остаточное действие лекарства от предыдущего

лечения, и была сведена к базовому уровню и вычтена из РК данных после rFIXFc дозирования.

[0202] Получившийся в результате средний терминальный полупериод ($56,7 \pm 10,9$ часов, диапазон 42,4 – 74,5 часа) и MRT ($71,8 \pm 10$ часов, диапазон 53,2 – 85,9 часа) rFIXFc приблизительно в 3 раза длиннее, чем сообщаемые для rFIX. Сообщаемый терминальный полупериод rFIX составляет $19,3 \pm 4,97$ часов (диапазон 11,1 - 36,4 часов) и MRT $26,0 \pm 6,07$ часов (диапазон 15,8 – 46,1 часов). Roth *et al.*, *Blood* 98:3600-3606 (2001); и Summary of Product Characteristics for BENEFIX™, Electronic Medicines Compendium (2010) (http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20376/SPC/BENEFIX™/#PHARMACODYNAMIC_PROPS), каждая из которых включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Таким образом, диапазоны для rFIXFc не перекрывают диапазоны для rFIX. Подобным образом, среднее CL rFIXFc активности ($3,18 \pm 0,78$ мл/ч/кг, диапазон 2,05 – 4,18 мл/ч/кг) приблизительно в 2,6 раза меньше, чем сообщаемое для rFIX ($8,40 \pm 2,01$ мл/ч/кг, диапазон 4,66 – 13,64 мл/ч/кг), тогда как V_{ss} обоих белков сравнимы при 4-5 кратном объеме плазмы.

[0203] Хотя та же тенденция улучшения показателей наблюдалась при rFIXFc антигене РК, и $T_{1/2\alpha}$, и $T_{1/2\beta}$ rFIXFc антигена были достоверно длиннее, чем исходит из подсчетов FIX активности. $T_{1/2\alpha}$, оцененный для rFIXFc антигена, определенно отклоняется от того, который в норме связан с FIX (2 – 3 часа). Кроме того, возможное недостаточное вымывание от заместительной терапии до исследования перед вливанием rFIXFc иногда приводило к более высокому базовому значению, которое в свою очередь могло приводить к недооценке rFIXFc $T_{1/2\beta}$, как подсчитано по FIX активности. Многие пациенты имели aPTT активность до 3 ME/дл, что значительно превышает предельное количество (1 ME/дл) для aPTT анализа, на последних временных точках 336 часов (14 дней) после дозы. Однако эти временные точки были исключены из оценки терминального полупериода, поскольку эти значения или находились на базовых уровнях, или были лишь слегка выше их, что рассматривалось как возвращение к базовому уровню. Напротив, низкие но детектируемые терминальные уровни rFIXFc могут быть обнаружены путем специфичного и высокочувствительного rFIXFc антиген ИФА, который детектирует 0,1 ME/дл, в сравнении с самым нижним лимитом для aPTT в 1,0 ME/дл.

[0204] Оставшиеся PK параметры (активность) изменялись незначительно в соответствии с полупериодом элиминации и MRT. См. Таблицу 27(B). Дозопропорциональное линейное повышение FIX активности наблюдалось на основе C_{max} , возникающего сразу же после вливания и AUC_{INF} (Таблица 4). FIX активность демонстрировала биэкспоненциальное затухание после вливания rFIXFc и характеризовалась быстрой фазой распределения (альфа), за которой следовала линейно-логарифмическая фаза элиминации (бета). Средний полупериод распределения ($T_{1/2\alpha}$) был высоко вариабелен у отдельных пациентов (среднее 3,4 и 10,3 часов для двух групп с более высокими дозами) (Таблица 27(B)). Средний полупериод элиминации ($T_{1/2\beta}$) был дозозависимым в тестируемом терапевтическом дозовом диапазоне, то есть, 53,5 часов, $57,5 \pm 8,2$ часов и $56,5 \pm 14,1$ часов при 25 МЕ/кг, 50 МЕ/кг и 100 МЕ/кг, соответственно. Время 1% (1 МЕ/дл) выше базовой линии, при оценке rFIXFc активности, показало дозопропорциональное возрастание. Это составляло 7,3; $10,1 \pm 1,5$ и $12,3 \pm 2,5$ дней для доз 25, 50 и 100 МЕ/кг, соответственно. На 168 часах (1 неделя) после дозы плазматическая FIX активность установилась как 1,1 МЕ/дл, $2,5 \pm 0,9$ МЕ/дл и $4,6 \pm 1,7$ МЕ/дл выше базового уровня для 25, 50 и 100 МЕ/кг дозовых групп, соответственно. Также дозозависимыми были MRT, CL и Vss в пределах дозового диапазона от 25 до 100 МЕ/кг. Кроме того, каждый 1 МЕ/кг влитого rFIXFc поднимал плазматическую FIX активность в среднем на $0,93 \pm 0,18$ МЕ/дл (Таблица 27(B)), и это увеличение концентрации (K) показало слабую позитивную корреляцию с весом тела ($R^2=0,336$, $p=0,048$)

[0205] Долговременный эмпирический клинический опыт подтверждает, что постоянной активности фактора в плазме на уровне 1-2 МЕ/дл будет достаточно для предотвращения спонтанных случаев кровотечения у пациентов с тяжелой гемофилией A и B, (Nilsson *et al.*, *J. Intern. Med.* 232:25-32 (1992), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки), и учащенные случаи кровотечения связаны с количеством времени ниже 1% от нормальной FVIII активности. Collins *et al.*, *Thromb Haemost* 7:413-420 (2009), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Таким образом, PK анализы предоставляют средства для оптимизации профилактического лечения с индивидуализированным моделированием дозы для достижения постоянных минимальных уровней выше 1% (1 МЕ/дл) от базового уровня, уменьшения вариабельности пик/минимум и улучшения соотношения стоимость/эффективность лечения. Carlsson *et al.*, *Haemophilia* 4:83-88 (1998); Kisker *et al.*, *Haemophilia* 9:279-

284 (2003), каждая из которых включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.

[0206] Для создания профилей концентрация-время, соответствующих различным режимам дозирования, было проведено моделирование по способу Монте-Карло с использованием популяционной PK модели rFIXFc. Средние оценки параметров модели (CL, объем распределения, внутри-компарментный клиренс и объем второго компартмента) в тестируемой популяции, вариабельность между отдельными индивидуумами, и остаточная вариабельность были адаптированы для этой Фазы 1/2a исследования. Wang *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 49:1012-1024 (2009), которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Одна тысяча пациентов была смоделирована на дозовый режим с 14-16 точками взятия проб для каждого пациента. Было 14 точек взятия проб для еженедельного дозирования, 15 для дозирования каждые 10 дней, и 16 для дозирования раз в 2 недели. Вес тела (BW) был смоделирован в соответствии с опубликованным способом, Wang *et al.* (2009), то есть на основестепенного уравнения $Z=BW-0,5$. Медианный BW у 1000 пациентов был предположен как 75 кг. На основе смоделированных профилей концентрация-время, среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD) лекарственных профилей концентрация-время у 1000 пациентов было сконструировано графически для различных режимов дозирования. Фигура 25.

[0207] В сравнении со стандартным рекомендованным дозовым режимом от 25 до 40 МЕ/кг FIX дважды в неделю, моделирующие результаты медианной rFIXFc активности PK из этого исследования показывают, что дозирование один раз в неделю rFIXFc при 20 МЕ/кг, или каждые 10 дней при 40 МЕ/кг, или каждые 2 недели при 100 МЕ/кг достаточно для поддержания минимального уровня 1% выше базового уровня. Фигура 25. Эти модель-прогнозируемые оценки подтверждены доступными данными этой Фазы 1/2a исследования, которые полностью попадают в 95% доверительный интервал моделированной кривой «активность по отношению ко времени». Однако, принимая во внимание гетерогенность сообщаемых клинических случаев прорывного кровотечения по отношению к минимальному уровню плазматической FIX активности (Bjorkman, *Haemophilia*, 9:101-110 (2003); Ahnstrom *et al* *Haemophilia*, 10:689-697 (2004), каждая из которых включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки), поддерживающая доза скорее всего будет требовать индивидуального подбора.

Таблицы

Таблица 1: Полинуклеотидные последовательности: FIX-Fc

A. FIX-Fc цепи ДНК последовательность (SEQ ID NO:1, которая кодирует SEQ ID NO:2)

pSYN-FIX-030 Нуклеотидная последовательность (nt 1 до 7583):

FIX экзон 1 (сигнальный пептид, 1-я аминокислота пропептида): nt 690-777

FIX мини интрон: nt 778-1076

FIX пропептидная последовательность : nt 1077-1126

Зрелая FIX последовательность : nt 1127-2371

Fc : nt 2372-3052

gcgcgcgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggggtcattagttcatagcccataatg
gagttccgcgttacataaactacggtaaatggccgcctgggtgaccgcccacgaccccgccattgacgtcaat
aatgacgtatgttcccatagtaaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagatattacggtaaaactg
cccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc
tggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattac
catgggtgatgcgggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccacc
ccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccca
ttgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaacccac
tgcttactggcttatcgaaattaatacgcactcactatagggagacccaagcttcgcgacgtacggccgcccaccatgc
agcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatctactcagtgctgaa
tgtacaggtttgtttccttttttaaaatacattgagtatgcttgcccttttagatatagaaatatctgatgctgtctt
cttcactaaattttgattacatgatttgacagcaaatattgaagagcttaacagccagcacgcaggttggtaagtact
gtgggaacatcacagattttggctccatggcctaaagacaaattggctttcagattatttggattaaaaacaagac
tttcttaagagatgtaaaattttcatgatgttttcttttttgctaaaactaaagaattattcttttacatttcagtt
tttcttgatcatgaaaacgccaaacaaaattctgaatcgcccaaagaggtataaattcaggtaaattggaagagtttgt
tcaagggaatctagagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactg
aaagaacaactgaattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcagt
tgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaac
atgtaacattaaagaattggcagatgagcagcagtttgtaaaaatagtgctgataacaaggtgggttgcctcctgtactg
agggaatctcagatttgcagaaaaccagaagtcctgtgaacagcagtgccatttccatgtggaagagttctgtttca
caaacttctaagctcaccgcgtgctgagactgttttctctgatgtggactatgtaaatctactgaagctgaaacccat
tttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatagacttcactcggttgttgggtggagaagatgccaaaccag
gtcaattcccttggcaggttgtttgaaatggttaaagttgatgcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaaatgg
attgtaactgctgccactgtgttgaactggtgttaaaattacagttgtgcaggtgaacataatattgaggagac
agaacatacacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtaac
accatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgtgtgac
aaggatacacgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagtcctccacaaaggag
atcagcttttagttcttcagtaaccttagagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcacca
tctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccat
gttactgaagtgggaaggaccagtttcttaactggaattattagctgggtgaagagtggtcaatgaaaggcaata
tggaatatataccaaggtgtcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactgacaaaactcacacat
gcccacgtgcccagctccggaactcctgggcggacgctcagtccttctctccccccaaaacccaaggacacctc
atgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtaaacagcagctaccgtgtgg
tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaaacccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatc
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgg
agtgggagagcaatgggcagccggagaaacaaactacaagaccacgcctcccggtgttgactccgacggctccttcttc
ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgagaattcagacatgataagatacatt
gatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgcttt
atttgaccattataagctgcaataaacaagttgggtggcggaagaaactccagcatgagatccccgcgtggagg
atcatccagccggcgtcccgaaaacgattccgaagcccaaccttcatagaaggcggcggtggaatcgaaatctcgc
tagcacgtgtcagtcctgctcctcgccacgaagtgcacgcagttgccggccgggtcgcgagggcggaactccccgc

cccacggctgctcgccgatctcggatcatggccggcccgaggcgctccggaagtctcgtggacacgacacctcgaccac
tcggcgtagacgtcgtccaggccgcgacccacacccaggccagggtgtgtcgggcaccacctggctcctggaccgc
gctgatgaacaggggtcacgtcgtccgggaccacacccggcgaagtctcctccacgaagtcccgaggagaacccgagcc
ggctcggctccagaactcgaccgctccggcgacgtcgcgcgggtgagcaccggaacggcactgggtcaacttggccatg
gttttagttcctcaccttgtcgtattatactatgccgatatactatgccgatgattaatgtcaacacgtgctgatca
gatccgaaaatggatatacaagctcccgaggagctttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctcactactt
ctggaatagctcagaggcagagggcgccctcgccctctgcataaataaaaaaattagtcagccatggggcggaat
ggcggaactggcgaggtagggggcgaggatggcgaggtagggggcgggactatggttgcctgactaattgagatgc
atgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctgggttgcctgactaattgagatgcctg
ttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctcgtcgagctagcttctgtagggctccgggtgc
cgtcagtgggcagagcgacacatcgccacagtcggcgagaagttggggggaggggtcggaattgaaccgggtgcta
gagaaggtggcgggggtaaactgggaaagtgtgtcgtgactggctccgctttttcccgagggtgggggagaac
cgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacaggtaagtgcctg
tgtggttcccggggctggcctctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattacttccacctggctccagta
cgctattcttgatccgagctggagcaggggcgcccttgcccttaggagcccttcgctcgtgctttagtga
ggcctggcctggcgctggggcgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttcgataagt
ctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgtttttttctggcaagatagcttgtaaatgccccag
gatctgcacactgggtatttccggtttttggggcgccggcgggcgacggggcccgctgcgtccacgcacatgttcggc
gaggcggggctgcgagcgccgccacagagaatcggaacggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgctg
gcctcgcccgccgctgtatcgcccgccctggcggaaggctggccgggtcggcaccagttagcgtgagcggaaaga
tggcgcttccggccctgctccagggggctcaaaatggaggacggcgctcgggagagcgggggggtgagtcacc
cacacaaaggaaagggccttccgctcctcagcgtcgttccatgtgactccacggagtaccggcgccctccaggc
acctcgattagttctggagcttttgagtagctcgtcttaggttggggggaggggttttatgcgatggagtttccc
cacactgagtggtggagactgaagtaggacagcttgccacttgatgtaattctccttgaatttgccctttttga
gtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcttccatttcagggtgctgtaaac
gtggtcgccggcgcccgccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttcc
actggtgacaaaactcacacatgccacagctgccagcacctgaactcctgggaggacagtcagttcctcttccc
ccaaaaacccaaggacacctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaag
acctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccggggaggagcag
tacaacagcatcaccatccgtgtggtcagcgtcctcaccgctcctgcaccaggaactggctgaatggcaaggatcaagt
caaggtctccacaaagccctcccgacccccatcgaaaaacacatctccaaagccaaagggcagcccgagaaccac
aggtgtacacctgcccccatcccgcatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccgagacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccaagcctccggtgt
ggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctct
catgctccgtgatgcatgaggtctgcacaacctacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgactc
gagagatctggccggctgggcccgtttcgaaggtaaagcctatccctaaacctctcctcggtctcgattctacgcgt
ccggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgctcctgcaccaggaactggctgaatggcaaggatcaagt
gttgtttgccccctccccgtgcctccttgacctggaaggtgccactcccactgtccttctcctaaataaatgagga
aattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggatt
gggaagacaatagcaggcatgctggggatgagggtgggtctctatggctctgaggcggaagaaaccagtggtggtaat
acggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgt
aaaaggccgctgtgctggcgtttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagttag
aggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggtttccctagaagctcctcgtgcgtctcctgttcc
gacctgcccgttaccgataacctgtccgctttctccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgta
ggatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggtgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcgtgc
gccttatccggtaaactatcgtcttgagtcacacccggttaagacacgaacttatcgccactggcagcagccactggt
caggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgtacagagttcttgaaagtgggtggcctaactacggctacactaga
gaacagtatgttggtatctgcgtctgctgaagccagttaccttcggaagagagttggtagctcttgatccggcaaa
caaacaccgctggttagcgtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaagggtatcgaaga
tcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgggtcatgacattaa
cctataaaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgctttcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatg
cagctcccgagacggtcacagcttgtctgtaagcggtatgcccggagcagacaagcccgtagggcgctcagcggg
tgttgccgggtgtcggggtggttaactatcgccatcagagcagattgtactgagagtgacccatatatgcggtg
tgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttggg
aaggcgatcggtgcggcctcttcgctattacgcca

В. Fc ДНК последовательность (мышинный Igκ сигнальный пептид подчеркнут) (SEQ ID NO:3, которая кодирует SEQ ID NO:4) Это Fc кассета из pSYN-FIX-030. Кроме того, существует раздельная Fc экспрессионная кассета, которая трансфицируется в клеточную линию в плазмидную pSYN-Fc-015, которая кодирует ту же самую аминокислотную последовательность, но содержит несколько некодирующих цепей. Вторая копия Fc кодирующей последовательности запускает в работу больший мономер: димер соотношение.

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggtccagggtccactggtgacaaaactcacacatgcc
caccgtgcccagcacctgaactcctgggaggaccgtcagtcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatga
tctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtac
gtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccc
agccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcc
cgcgatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgga
gtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctccttctcc
tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagaggt
ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

Таблица 2: Полипептидные последовательности

FIX-Fc Мономер гибрид: создан коэкспрессией FIX-Fc и Fc цепей.

A. FIX-Fc цепь (SEQ ID NO:2):

(28-аминокислотная сигнальная последовательность подчеркнута, 18-аминокислотный пропептид подчеркнут двойной линией, Fc участок выделен курсивом.) С-терминальный лизин не представлен ни в одной субъединице; этот процессинг часто наблюдается в рекомбинантных белках, вырабатываемых в культуре клеток млекопитающих, а также в белках, полученных из плазмы крови.

FIXFC-SC СУБЪЕДИНИЦА:

FIX Сигнальный пептид : -46 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAEC

FIX Пропептид : -18 TVFLDHENAN KILNRPKR

1 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTTE FWKQYVDGDQ
51 CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCDFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK
101 NSADNKVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF
151 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG
201 KVDAFCGGSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV
251 IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL
301 KFGSGYVSGW GRVFHKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNNMFC
351 AGFHEGGRDS CQGDSGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK
401 VSRVYNWIKI KTKLTDKTH *CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR*
451 *TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV*
501 *LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR*
551 *DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF*
601 *LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*

В. Fc цепь (SEQ ID NO:4)

20-аминокислотный сигнальный пептид легкой цепи гетерологичного мышиного Igκ (подчеркнуто):

-20 METDTLLLWV LLLWVPGSTG

Зрелая Fc последовательность (в соответствии с нумерацией человеческого IgG1 аминокислот с 221 по 447, нумерация EU)

```
1  DKTHTCPPCP  APELLGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED
51  PEVKFNWYVD  GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK
101 CKVSNKALPA  PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSRDELTK  NQVSLTCLVK
151 GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLYSKL  TVDKSRWQQG
201 NVFSCSVMHE  ALHNHYTQKS  LSLSPGK
```

Таблица 3. Концентрация антигена FIXFc у отдельного пациента в соответствии с временными данными; рассортировано по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности вливания и номеру пациента

Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)
Пациент 1		Пациент 2		Пациент 3		Пациент 4	
-0,50	0,0	-1,23	0,0	-0,18	0,0	-0,18	0,0
0,17	2325,3	0,17	3352,1	0,28	5915,3	0,17	8166,5
0,42	1632,4	0,40	3017,3	0,42	6574,3	0,42	7362,3
1,17	1497,7	1,15	2280,7	1,17	5764,7	1,17	6723,4
3,18	1466,4	3,15	2077,5	3,17	4204,8	3,17	5291,4
6,13	1268,2	6,15	2054,7	6,17	3956,2	6,18	4673,1
9,12	1100,7	9,15	1700,4	9,17	3567,7	9,17	3954,6
24,12	805,0	24,23	1417,3	24,17	2805,6	24,17	3327,6
48,03	544,5	48,40	766,0	48,98	1727,7	48,20	2148,7
72,23	377,7	70,73	719,0	72,40	1165,8	72,17	1632,2
96,75	215,3	92,57	480,2	96,98	917,1	96,17	1234,4
120,13	192,6	119,98	326,3	121,23	673,9	120,13	894,0
141,95	128,6	141,10	241,1	168,65	568,2	144,18	645,2
169,45	112,4	167,98	194,6	240,15	265,4	168,22	564,1
192,37	93,6	192,85	160,1	290,97	286,4	192,20	509,2
216,28	76,1	216,98	149,0	337,98	238,5	216,23	474,5
237,30	76,4	238,65	125,7			240,23	446,1

Таблица 3. Концентрация антигена FIXFc у отдельного пациента в соответствии с временными данными;
 рассортировано по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности вливания и номеру пациента (продолжение)

Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)
Пациент 5		Пациент 6		Пациент 7		Пациент 8	
-0,18	0,0	-0,07	0,0	-1,27	0,0	-1,37	0,0
0,17	7520,2	0,17	11671,7	0,22	7055,9	0,25	27413,4
0,43	7233,9	0,42	8654,5	0,42	6215,7	0,47	23640,8
1,20	6752,1	1,17	8880,4	1,17	5498,6	1,35	18505,6
3,15	5873,1	3,17	8509,3	3,17	4477,7	3,22	15708,1
6,23	5919,2	6,17	7618,7	6,17	4084,8	6,17	14915,6
9,20	5332,9	9,17	6584,2	9,17	3888,9	9,17	16486,4
24,17	4215,9	48,17	3217,7	24,17	2849,4	24,72	9937,8
48,15	2986,6	72,17	1651,6	48,82	1630,6	48,90	6383,5
72,15	1933,3	96,17	1580,1	72,57	1295,7	72,38	4190,6
96,03	1249,0	120,17	722,7	96,57	1150,7	96,40	3774,7
120,13	401,4	240,17	329,5	121,15	954,9	120,30	2514,9
144,03	482,3	288,17	292,7	144,10	780,6	168,77	1626,0
168,17	478,0	336,17	252,7	168,82	447,6	240,27	924,7
192,12	433,7			192,77	446,5	288,83	682,4
216,15	368,9			240,57	427,8	337,03	586,4
240,07	264,0						

Таблица 3. Концентрация антигена FIXFc у отдельного пациента в соответствии с временными данными;
 рассортировано по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности вливания и номеру пациента (продолжение)

Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)	Фактическ ое время (ч)	Концентраци я (нг/мл)
Пациент 9		Пациент 10		Пациент 11		Пациент 12	
-0,82	0,0	-0,48	0,0	-0,15	0,0	-1,12	0,0
0,28	15027,1	0,25	16760,0	0,23	19641,7	0,17	15194,5
0,63	13374,1	0,50	11529,0	0,47	17267,2	0,42	12255,7
1,17	12395,6	1,22	10566,3	1,22	15902,2	1,17	11171,3
3,20	10808,4	3,22	9889,0	3,22	13708,9	3,17	9835,4
6,22	9640,2	6,22	8290,2	6,25	12469,4	6,17	8513,2
9,15	10505,5	9,22	7114,7	9,22	12029,8	9,17	8413,0
23,15	6487,3	24,22	5877,0	24,22	8083,3	24,17	5538,2
46,62	5324,8	48,22	3980,4	47,72	4431,0	48,20	3885,5
70,10	2895,5	72,22	2455,6	71,88	2162,6	72,13	2959,9
94,15	3208,3	96,12	2052,6	191,72	1468,7	95,17	2215,4
118,13	2610,6	120,22	1302,5	263,72	428,6	119,17	1799,7
166,10	2007,2	144,22	1349,3			167,38	1339,7
238,15	1086,2	168,22	1221,0			239,50	892,4
286,15	942,8	192,18	910,2			287,25	646,9
335,57	621,3	216,22	136,2				

Таблица 4. Суммарные данные по фармакокинетике FIXFc антигена – отдельные пациенты и среднее групповое значение

Номинальная доза (МЕ/кг)	Фактическая доза (МЕ/кг)	Эквивалент дозы (мг/кг)	Пациент	C _{max} (нг/мл)	AUC _{INF} (ч*нг/мл)	CL* (мл/ч/кг)	V _{ss} * (мл/кг)	MRT* (ч)	Альфа HL* (ч)	Бета HL* (ч)
12,5	13,714	0,228	1	1670	91300	2,50	245	98,2	21,2	107
	N			1	1	1	1	1	1	1
25	27,250	0,453	2	2730	144000	3,14	273	87,1	11,3	71,0
	N			1	1	1	1	1	1	1
50	54,5	0,905	3	5470	356000	2,54	366	144	18,6	138
	54,5	0,905	4	6910	389000	2,32	244	105	10,6	85,3
	54,5	0,905	5	7520	416000	2,17	184	84,5	NC	94,3
	54,513	0,906	6	11700	531000	1,71	190	112	NC	140
	55,878	0,928	7	5950	348000	2,67	310	116	10,1	93,9
	N			5	5	5	5	5	3	5
	Среднее			7510	408000	2,28	259	112	13,1	110
	SD			2480	73900	0,374	78,5	21,5	4,77	26,5
	SE			1110	33100	0,167	35,1	9,60	2,75	11,8
	Среднее геометрическое			7230	403000	2,26	250	111	12,6	108
	CV% среднее геометрическое			30,3	17,1	17,6	30,8	19,4	34,9	23,8
100	109	1,81	10	12500	667000	2,72	263	96,8	9,79	78,0
	109	1,81	8	21600	1200000	1,51	156	103	15,7	94,3
	109	1,81	9	13400	998000	1,81	248	137	11,5	107
	109,176	1,81	11	17200	844000	2,15	226	105	13,0	97,1
	109,441	1,82	12	12500	778000	2,34	295	126	10,6	102
	N			5	5	5	5	5	5	5
	Среднее			15400	897000	2,11	238	114	12,1	95,8
	SD			3960	206000 ^a	0,464 ^b	52,2 ^c	17,1	2,33	11,1
	SE			1770	92000	0,208	23,3	7,64	1,04	4,96
	Среднее геометрическое			15100	878000	2,06	232	113	11,9	95,2
	CV% среднее геометрическое			24,5	22,9	22,9	24,7	14,8	118,7	12,2

* CL, V_{ss}, MRT, T_{1/2} α и T_{1/2} β для комбинированных 12,5-100 МЕ/кг доз составляют 2,30±0,46 (1,51-2,72); 250±58,2 (156-366); 110±18,5 (84,5-144); 12,0±4,0 (10,1-18,6, не включая двух пациентов, чьи РК параметры были определены по некомпартментному

анализу); и $101 \pm 20,9$ (78-140), соответственно. Вследствие коррекции округления или других ошибок, (а) должно быть 207000, и (b) должно быть 0,468, (с) должно быть 52,1.

Таблица 5. Средняя активность FIXFc у отдельных пациентов и групповая и скорректированная по базовому уровню FIXFc активность по сравнению с временными данными;
Распределено по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности введения и номеру пациента

Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)
Пациент 1			Пациент 2			Пациент 3		
-309,80	2	NC	-310,60	3	NC	-524,08	< 1,0	NC
-0,50	3	0,0	-1,23	2	0,0	-0,18	2	0,0
0,17	16	13,0	0,17	23	21,0	0,28	44	42,0
0,42	11	8,1	0,40	19	17,0	0,42	31	29,0
1,17	10	7,1	1,15	15	13,0	1,17	27	25,1
3,18	12	9,4	3,15	13	11,0	3,17	22	20,2
6,13	9	6,6	6,15	11	9,0	6,17	18	16,4
9,12	10	7,9	9,15	13	11,0	9,17	17	15,6
24,12	7	5,0	24,23	8	6,0	24,17	12	11,0
48,03	6	4,0	48,40	6	4,0	48,98	7	6,0
72,23	4	2,0	70,73	6	4,0	72,40	6	5,0
96,75	3	1,0	92,57	4	2,0	96,98	6	5,0
120,13	3	1,0	119,98	4	2,0	121,23	5	4,0
141,95	3	1,0	141,10	4	2,0	168,65	3	2,0
169,45	2	0,0	167,98	3	1,0	240,15	1	0,0
192,37	3	1,0	192,85	2	0,0	290,97	1	0,0
216,28	3	1,0	216,98	3	1,0	337,98	1	0,0
237,30	3	1,0	238,65	3	1,0	675,22	2	1,0
746,22	3	1,0	891,90	2	0,0			

Примечание: Данные, выделенные полужирным шрифтом, представляют возврат к базовому уровню и были исключены из анализа.

Таблица 5. Средняя активность FIXFc у отдельных пациентов и групповая и скорректированная по базовому уровню FIXFc активность по сравнению с временными данными;
 Распределено по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности введения и номеру пациента (продолжение)

Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)
Пациент 4			Пациент 5			Пациент 6		
-285,52	1	NC	-104,18	< 1,0	NC	-503,20	3	NC
-0,18	< 1,0	0,0	-0,18	< 1,0	0,0	-0,07	3	0,0
0,17	59	58,0	0,17	35	34,0	0,17	3	0,0
0,42	45	44,0	0,43	30	29,0	0,42	64	61,0
1,17	40	39,0	1,20	25	24,0	1,17	57	54,1
3,17	30	29,0	3,15	21	20,0	3,17	54	51,3
6,18	26	25,0	6,23	19	18,0	6,17	42	39,6
9,17	22	21,0	9,20	NR	NR	9,17	43	40,9
24,17	14	13,0	24,17	13	12,0	24,17	26	24,0
48,20	9	8,0	48,15	9	8,0	48,17	17	15,0
72,17	8	7,0	72,15	7	6,0	72,17	13	11,0
96,17	5	4,0	96,03	5	4,0	96,17	10	8,0
120,13	4	3,0	120,13	4	3,0	120,17	9	7,0
144,18	4	3,0	144,03	3	2,0	168,17	6	4,0
168,22	3	2,0	168,17	2	1,0	240,17	4	2,0
192,20	3	2,0	192,12	2	1,0	288,17	3	1,0
216,23	2	1,0	216,15	2	1,0	336,17	4	2,0
240,23	2	1,0	240,07	2	1,0	504,17	3	1,0
720,73	< 1,0	0,0	547,07	< 1,0	0,0			

Примечание: Данные, выделенные полужирным шрифтом, представляют возврат к базовому уровню и были исключены из анализа..

Таблица 5. Средняя активность FIXFc у отдельных пациентов и групповая и скорректированная по базовому уровню FIXFc активность по сравнению с временными данными;

Распределено по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности введения и номеру пациента (продолжение)

Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактическое время (ч)	Результат (МЕ/дл)	Скорректированный по базовому уровню результат (МЕ/дл)
Пациент 7			Пациент 8			Пациент 9		
-438,43	< 1,0	NC	-120,42	< 1,0	NC	-193,05	8	NC
-1,27	4	0,0	-1,37	< 1,0	0,0	-0,82	3	0,0
0,22	46	42,0	0,25	129	128,0	0,28	100	97,0
0,42	38	34,1	0,47	117	116,0	0,63	93	90,1
1,17	30	26,2	1,35	102	101,0	1,17	94	91,1
3,17	28	24,5	3,22	98	97,0	3,20	80	77,3
6,17	24	20,8	6,17	80	79,0	6,22	69	66,6
9,17	22	19,2	9,17	72	71,0	9,15	64	61,9
24,17	14	12,4	24,72	53	52,0	23,15	47	45,0
48,82	10	9,0	48,90	30	29,0	46,62	25	23,0
72,57	6	5,0	72,38	19	18,0	70,10	17	15,0
96,57	5	4,0	96,40	14	13,0	94,15	13	11,0
121,15	4	3,0	120,30	9	8,0	118,13	9	7,0
144,10	3	2,0	168,77	6	5,0	166,10	5	3,0
168,82	2	1,0	240,27	3	2,0	238,15	3	1,0
192,77	2	1,0	288,83	2	1,0	286,15	2	0,0
240,57	2	1,0	337,03	2	1,0	335,57	2	0,0
744,57	3	2,0	840,28	< 1,0	0,0	741,77	3	1,0

Примечание: Данные, выделенные полужирным шрифтом, представляют возврат к базовому уровню и были исключены из анализа.

Таблица 5. Средняя активность FIXFc у отдельных пациентов и групповая и скорректированная по базовому уровню FIXFc активность по сравнению с временными данными;
Распределено по номинальной дозе, фактической дозе, продолжительности введения и номеру пациента (продолжение)

Фактиче ское время (ч)	Результ ат (МЕ/дл)	Скорректирова нный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактич еское время (ч)	Результ ат (МЕ/дл)	Скорректирова нный по базовому уровню результат (МЕ/дл)	Фактич еское время (ч)	Результ ат (МЕ/дл)	Скорректирова нный по базовому уровню результат (МЕ/дл)
Пациент 10			Пациент 11			Пациент 12		
-334,63	1	NC	-912,28	2	NC	-342,58	2	NC
-0,48	2	0,0	-0,15	2	0,0	-1,12	2	0,0
0,25	120	118,0	0,23	110	108,0	0,17	108	106,0
0,50	104	102,0	0,47	106	104,0	0,42	90	88,0
1,22	84	82,1	1,22	96	94,0	1,17	70	68,0
3,22	75	73,2	3,22	92	90,0	3,17	69	67,0
6,22	60	58,4	6,25	81	79,0	6,17	55	53,0
9,22	56	54,6	9,22	70	68,0	9,17	55	53,0
24,22	36	35,0	24,22	53	51,0	24,17	37	35,0
48,22	21	20,0	47,72	33	31,0	48,20	25	23,0
72,22	14	13,0	71,88	25	23,0	72,13	14	12,0
96,12	11	10,0	167,72	8	6,0	95,17	10	8,0
120,22	7	6,0	191,72	8	6,0	119,17	7	5,0
144,22	6	5,0	263,72	4	2,0	167,38	6	4,0
168,22	6	5,0	359,72	3	1,0	239,50	3	1,0
192,18	4	3,0	383,97	3	1,0	287,25	2	0,0
216,22	85	84,0	890,97	14	12,0	526,42	4	2,0
744,95	2	1,0						

Примечание: Данные, выделенные полужирным шрифтом, представляют возврат к базовому уровню и были исключены из анализа.

Таблица 6. Фармакокинетические суммарные данные по средней активности FIXFc у отдельных пациентов и групповой;
Распределено по номинальной дозе, фактической дозе и номеру пациента

Номинал ная доза (МЕ/кг)	Фактическая доза (МЕ/кг)	Пациен т	C _{max} (МЕ/д л)	AUC _{INF} (ч*МЕ/дл)	AUC _α (%)	AUC _β (%)	AUC/Доза (МЕ*ч/дл на МЕ/кг)	Cl (мл/ч/кг)	V ₁ (мл/кг)	V _{ss} (мл/кг)	MRT (ч)	Альф а HL (ч)	Бета HL (ч)
12,5	13,714	1	11,9	418	0,231	99,8	30,5	3,28	102	157	48,0	0,140	33,3
	N		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	27,25	2	19,9	753	2,50	97,8	27,6	3,62	134	275	76,0	1,20	54,0
	N		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	54,5	3	34,5	1280	5,7	94,5	23,5	4,26	155	365	85,8	2,32	62,9
	54,5	4	48,5	1450	12,4	87,7	26,6	3,76	111	282	75,1	3,64	58,9
	54,5	5	33,0	1190	1,5	98,3	21,8	4,58	160	274	59,9	0,840	42,1
	54,513	6	53,5	2960	1,0	99,1	54,3	1,84	100	149	81,1	1,07	56,7
	55,878	7	38,6	1270	2,2	97,9	22,7	4,41	141	248	56,4	1,07	40,0
	N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее		41,6	1630	4,56	95,5	29,8	3,77	133	264	71,7	1,79	52,1
	SD		8,97 ^a	750	4,75	4,70	13,8	1,12	26,7	77,6	13,0	1,19	10,4
	SE		4,01	335	2,13	2,10	6,18	0,501	11,9	34,7	5,79	0,531	4,65
	Среднее геометрическое		40,9	1530	2,98	95,4	27,9	3,59	131	254	70,7	1,52	51,3
	CV% среднее геометрическое		21,4	39,1	136,5	5,0	39,4	39,4	21,1	33,8	18,8	68,6	21,0
100	109	10	98,9	3330	18,5	81,3	30,6	3,28	109	216	65,9	6,53	54,6
	109	8	111	4580	28,9	71,1	42,0	2,38	98,0	145	61,1	13,2	54,2
	109	9	92,1	3540	17,0	82,9	32,5	3,08	118	163	53,1	9,43	42,4 ^d
	109,176	11	99,1	5150	28,6	71,3	47,2	2,12	110	162	76,2	16,6	67,4
	109,441	12	89,9	3060	9,2	90,8	28,0	3,58	121	207	57,9	4,19	43,8
	N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее		98,2	3930	20,4	79,5	36,1	2,89	111	179	62,8	9,99	52,5
	SD		8,21 ^b	893 ^c	8,37	8,37	8,17	0,615	8,98	31,1	8,82	4,99	10,1
	SE		3,67	399	3,74	3,74	3,65	0,275	4,02	13,9	3,95	2,23	4,51
	Среднее		97,9	3860	18,9	79,1	35,4	2,83	111	177	62,4	8,92	51,7

	геометрическое											
	CV% Среднее геометрическое	8,2	22,4	49,7	10,5	22,4	22,5	8,2	17,4	13,8	59,4	19,0

Вследствие коррекции округления и других ошибок, (а) должно быть 8,98, (b) должно быть 8,23, (с) должно быть 892, и (d) должно быть 42,2.
Таблица 7А-7В. Вторичные фармакокинетические суммарные данные по средней активности FIXFc у отдельных пациентов и групповой;
Распределено по номинальной дозе, фактической дозе и номеру пациента

Номинал ная доза (МЕ/кг)	Факти ческая доза (МЕ/кг)	Пацие нт	C168 ^a (МЕ/дл)	TBLP1 ^b (День)	TBLP3 ^c (День)	TBLP5 ^d (День)	К значение ^e (МЕ/дл на МЕ/кг)	К значение ^f (МЕ/дл на МЕ/кг)	In Vivo повышени е концентра ции ^g (%)	In Vivo Повышен ие концентр ации ^h (%)
12,5	13,714	1	0,264	4,34	2,13	1,11	0,87	0,95	30,8	33,6
	N		1	1	1	1	1	1	1	1
25	27,25	2	1,09	7,28	3,72	2,06	0,73	0,77	31,8	33,5
	N		1	1	1	1	1	1	1	1
50	54,5	3	2,09	9,79	5,64	3,70	0,63	0,77	33,0	40,2
	54,5	4	2,08	9,58	5,69	3,89	0,89	1,06	37,8	45,2
	54,5	5	1,22	7,50	4,72	3,42	0,61	0,62	33,6	34,6
	54,513	6	4,61	12,2	8,47	6,72	0,98	1,12	38,2	43,6
	55,878	7	1,17	7,37	4,74	3,51	0,69	0,75	29,9	32,6
	N		5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее		2,23	9,29	5,85	4,25	0,76	0,86	34,5	39,2
	SD		1,40	1,98	1,54	1,39	0,17	0,22	3,5	5,5
	SE		0,627	0,886	0,687	0,623	0,074	0,0963	1,6	2,5
	Среднее геометрическо е		1,96	9,12	5,71	4,10	0,75	0,84	34,4	38,9

	CV% среднее геометрическое	60,0	21,2	24,1	28,6	21,5	25,4	10,2	14,4
--	---------------------------------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

^a C168 = Оцененная FIX активность выше базового уровня приблизительно 168 ч после дозы. Значение, выделенное курсивом, было оценено по стимуляции, осуществленной с использованием однокомпарментной модели и констант микроскопической степени пациента.

^b TBLP1 = Модель-прогнозируемое время после дозы, когда FIX активность уменьшается до приблизительно 1 МЕ/дл выше базового уровня. Значения, выделенные курсивом, были оценены по стимуляции, проведенной с использованием однокомпарментной модели и констант микроскопической степени пациента.

^c TBLP3 = Модель-прогнозируемое время после дозы, когда FIX активность уменьшается до приблизительно 3 МЕ/дл выше базового уровня.

^d TBLP5 = Модель-прогнозируемое время после дозы, когда FIX активность уменьшается до приблизительно 5 МЕ/дл выше базового уровня.

^e К-значение было рассчитано с использованием модель-прогнозируемого $C_{\max}$ значения, сгенерированного по результату с вычетом исходных вычтенных результатов, разделенных на дозу.

^f К-значение было рассчитано с использованием наблюдаемого максимального после дозы результата пробы; К-значение = (с вычетом базового уровня $C_{\max}$ наблюдаемый)/Доза).

^g In-vivo повышение концентрации = $100 \times (\text{модель-прогнозируемое } C_{\max} \text{ из данных с вычетом базового уровня}/\text{Доза}) \times \text{объем плазмы (дл)}/\text{Доза в МЕ}$; где объем плазмы в мл = $(23,7 \times \text{Ht в см}) + (9,0 \times \text{Wt в кг}) - 1709$.

^h In-vivo Recovery = $100 \times (\text{с вычетом базового уровня наблюдаемый } C_{\max}) \times \text{объем плазмы (дл)}/\text{Доза в МЕ}$; где объем плазмы в мл = $(23,7 \times \text{Ht in cm}) + (9,0 \times \text{Wt в кг}) - 1709$.

Таблица 7В

Номинал ная доза (МЕ/кг)	Фактиче ская доза (МЕ/кг)	Пациен т	C168 ^a (МЕ/дл)	TBLP1 ^b (День)	TBLP3 ^c (День)	TBLP5 ^d (День)	К значение ^e (МЕ/дл на МЕ/кг)	К значение] _f (МЕ/дл на МЕ/кг)	In Vivo повышен ие концентр ации ^g (%)	In Vivo повышени е концентра ции ^h (%)
100		10	4,08	11,6	8,01	6,34	0,91	1,08	43,4	51,8
	109	8	4,88	12,1	8,57	6,92	1,02	1,17	28,7	33,1
	109	9	3,09	9,87	7,07	5,78	0,84	0,89	39,7	41,8
	109,176	11	6,77	14,7	10,3	8,21	0,91	0,99	27,8	30,3
	109,441	12	3,09	9,96	7,07	5,72	0,82	0,97	35,8	42,2
	N		5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее		4,38	11,6	8,20	6,59	0,90	1,02	35,1	39,8
	SD		1,53	1,97	1,34	1,03	0,0784	0,11	6,8	8,5
	SE		0,685	0,881	0,597	0,459	0,0351	0,0482	3,0	3,8
	Среднее геометрическое		4,19	11,5	8,12	6,53	0,90	1,02	34,5	39,1
	CV% среднее геометрическое		34,1	16,5	15,7	15,0	8,6	10,5	19,8	21,6

Таблица 8. Исследование Фазы 1/2а: Сравнение PK параметров для rFIXFc и BENEFIX™

Параметры	*rFIXFc [Среднее±SD (min – max)] [N=11]	†BENEFIX™ [Среднее±SD (min – max)] [N=11]
t _{1/2} (часы)	52,5 ±9,2 (40 – 67,4)	19,3 ±4,97 (11,1 – 36,4)
MRT (часы)	68,05 ±11,16 (53,1 – 85,8)	26,0 ±6,07 (15,81 – 46,09)
CL (мл/час/кг)	3,36 ±0,93 (1,84 – 4,58)	8,4 ±2,01 (4,66 – 13,64)
Постепенное повышение концентрации (МЕ/дл на МЕ/кг)	0,93 ±0,18 (0,62 – 1,17) ^a	0,75 ±0,23 (0,34 – 1,38)
C _{max} (МЕ/дл на МЕ/кг)	24 ч после инъекции	
AUC	48 ч после инъекции	

* Оценки по 2-компарментному анализу FIX активности при номинальных дозах 25, 50 и 100 МЕ/кг (n=11)

†Суммарные характеристики продукта BENEFIX™ (18 ноября, 2009); Медиана и вариационный размах (n=56)

a. Диапазон, скорректированный из-за округления или других ошибок как 0,63 – 1,18.

По сравнению с данными в анамнезе по BENEFIX™, rFIX-Fc демонстрировал:

- 3х разовое возрастание периода полувыведения и среднего времени удержания
- 24% улучшенное сравнительное постепенное повышение концентрации
- 2,5х уменьшенный клиренс

Таблица 9. Фаза 1/2а исследования: дозопропорциональное возрастание C_{max} и AUC rFIXFc (активность)

Доза (МЕ/кг)	# пациентов	C _{max} (МЕ/дл) [Среднее±SD (min – max)]	AUC (ч*МЕ/дл) [Среднее±SD (min – max)]
25	1	19,9	753
50	5	41,6 ±8,97 (33,0 – 53,5)	1630 ±750 (1190 – 2960)
100	5	98,2 ±8,21 (89,9 – 111,0)	3930 ±893 (3060 – 5150)

Также см. Фигуру 5.

Таблица 10А-10В. Оцененная терапевтическая продолжительность rFIXFc в дозах 50 и 100 МЕ/кг.

Параметр	Геометрическая медиана
FIX:С на День 7	2,0 МЕ/дл (выше базового уровня)
Время при 1 МЕ/дл выше базового уровня	9,1 дней
Время при 3 МЕ/дл выше базового уровня	5,7 дней

Параметр	Геометрическая медиана
FIX:С на День 7	4,2 МЕ/дл (выше базового уровня)
Время при 1 МЕ/дл выше базового уровня	11,5 дней
Время при 3 МЕ/дл выше базового уровня	8,1 дней

См. также Фигуру 6А-6В.

Таблица 11. Дозопропорциональное возрастание C_{max} и AUC для rFIXFc антигена.

Доза (МЕ/кг)	# пациентов	C_{max} (нг/мл) [Среднее $\pm$ SD]	AUC (ч*нг/мл) [Среднее $\pm$ SD]
25	1	2730	144000
50	5	7510 $\pm$ 2480	408000 $\pm$ 73900
100	5	15400 $\pm$ 3960	897000 $\pm$ 206000

См. также Фигуру 7.

Таблица 12. Фармакокинетические оценки для rFIXFc антигена

Параметры	50 МЕ/кг [Среднее $\pm$ SD] (N=5)	100 МЕ/кг [Среднее $\pm$ SD] (N=5)
CL (мл/час/кг)	2,28 $\pm$ 0,37	2,11 $\pm$ 0,46
V _{ss} (мл/кг)	259 $\pm$ 78,5	238 $\pm$ 52,2
MRT (часы)	112 $\pm$ 21,5	114 $\pm$ 17,1
t _{1/2} (часы)	110 $\pm$ 26,5	95,8 $\pm$ 11,1

См. также Фигуру 8А-8В.

Таблица 13. Средние значения РК на основании активности

	C_{max} (МЕ/дл)	AUC_{INF} (ч*МЕ/дл))	AUC_a (%)	AUC_b (%)	AUC/Доза (МЕ*ч/дл на МЕ/кг)	C₁ (мл/кг)	V₁ (мл/ч/кг)	VSS (мл/кг)	MRT (ч)	t_{1/2α} (ч)	t_{1/2β} (ч)
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Средне е	65,364	2596,636	11,591	88,427	32,436	3,555	123,364	226,000	68,045	5,463	52,455
Ст, откл	32,9708	1497,1234	10,4490	10,5210	10,7506	0,9257	21,2804	69,7582	11,1637		9,1674
										5,4197	
%CV	50,4420	57,6563	90,1479	11,8980	33,1435	27,5890	17,2501	30,8664	16,4063		17,4768
										99,2128	
Медиа на	53,500	2960,000	9,200	90,800	28,000	3,580	118,000	216,000	65,900	3,640	54,200
Миним ум	19,90	753,00	1,00	71,10	21,80	1,84	98,00	145,00	53,10	0,84	40,00
Макси мум	111,00	5150,00	28,90	99,10	54,30	4,58	160,00	365,00	85,80	16,60	67,40
Геом. средне е	56,951	2181,294	6,781	87,826	31,020	3,226	121,767	216,533	67,218	3,326	51,715
				C₁₆₈ [1] (МЕ/дл)	TBLP₁ [2] (День)	TBLP₃ [3] (День)	TBLP₅ [4] (День)	Постепенное повышение концентрации	Постепенное повышение концентрац	In Vivo повышение концентрац	In Vivo повышение концентрац

								и [5] (МЕ/дл на МЕ/кг)	ии [6] (МЕ/дл на МЕ/кг)	ии [7] (%)	ии [8] (%)
			n	11	11	11	11	11	11	11	11
			Среднее	3,106	10,177	6,727	5,115	0,821	0,926	34,518	38,991
			Ст, откл	1,8231	2,3315	2,0089	1,8975	0,1387	0,1787	4,9250	6,6636
			%CV	58,6897	22,9088	29,8623	37,0944	16,8921	19,2940	14,2678	17,0900
			Медиана	3,090	9,870	7,070	5,720	0,840	0,970	33,600	40,200
			Минимум	1,09	7,28	3,72	2,06	0,61	0,62	27,80	30,30
			Максимум	6,77	14,70	10,30	8,21	1,02	1,17	43,40	51,80
			Геом, среднее	2,621	9,938	6,447	4,761	0,810	0,910	34,202	38,486

Сноски:

Примечание: Значения РК параметра были определены по 2-компарментному способу.

Геом. Среднее = Геометрическое Среднее

[1] C168 = FIX активность выше базового уровня на 168 ч после дозы.

[2] TBLP1 = Оцененное время после дозы, когда FIX активность уменьшилась до 1 МЕ/дл выше базового уровня.

[3] TBLP3 = Оцененное время после дозы, когда FIX активность уменьшилась до 3 МЕ/дл выше базового уровня.

[4] TBLP5 = Оцененное время после дозы, когда FIX активность уменьшилась до 5 МЕ/дл выше базового уровня.

[5] Нарастающее повышение концентрации было рассчитано с использованием модель-прогнозируемого C_{max} значения, сгенерированного из исходных вычтенных результатов, разделенных на дозу.

[6] Нарастающее повышение концентрации было рассчитано с использованием наблюдаемого максимального результата последозовой пробы;

Повышение концентрации = (с вычетом базового уровня наблюдаемое C_{max})/Доза.

[7] In-vivo повышение концентрации = 100 x (Модель-прогнозируемое C_{max} из с вычетом базового уровня данных/Доза) x Объем плазмы (дл)/Доза в МЕ;

где объем плазмы в мл = $(23,7 \times Ht \text{ в см}) + (9,0 \times Wt \text{ в кг}) - 1709$.

[8] In-vivo повышение концентрации = $100 \times (C \text{ вычетом базового уровня наблюдаемое } C_{max}) \times \text{Объем плазмы (мл)} / \text{Доза в МЕ}$; где объем плазмы в мл = $(23,7 \times Ht \text{ в см}) + (9,0 \times Wt \text{ в кг}) - 1709$.

Таблица 14. Средние значения РК на основе уровня антигена.

Номинальная доза (МЕ/кг)	Фактическая доза (МЕ/кг)	Эквивалентная доза (мг/кг)	Пациент	C _{max} (нг/мл)	AUC _{INF} (ч*нг/мл)	Cl (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	MRT (ч)	Альфа HL (ч)	Бетаа HL (ч)
12,5	13,714	0,228	1	1670	91300	2,5	245	98,2	21,2	107
25	27,25	0,453	2	2730	144000	3,14	273	87,1	11,3	71
50	54,5	0,905	3	5470	356000	2,54	366	144	18,6	138
	54,5	0,905	4	6910	389000	2,32	244	105	10,6	85,3
	54,5	0,905	5	7520	416000	2,17	184	84,5	NC	94,3
	54,513	0,906	6	11700	531000	1,71	190	112	NC	140
	55,878	0,928	7	5950	348000	2,67	310	116	10,1	93,9
100	109	1,81	10	12500	667000	2,72	263	96,8	9,79	78
	109	1,81	8	21600	1200000	1,51	156	103	15,7	94,3
	109	1,81	9	13400	998000	1,81	248	137	11,5	107
	109,176	1,81	11	17200	844000	2,15	226	105	13	97,1
	109,441	1,82	12	12500	778000	2,34	295	126	10,6	102
	N			12	12	12	12	12	12	12
	Среднее			9929,0	563525,0	2,3	250,0	109,6 ^b	13,2 ^c	100,7 ^c
	SD			5940,0	339925,0	0,5 ^a	58,2	18,5	4,0 ^d	20,9
	SE			1715,0	98128,0	0,1	16,8	5,3	1,3	6,0
	Геометрическое Среднее			8014,0	452356,0	2,3	243,7	108,2	12,8	98,8

Вследствие коррекции округления или других ошибок, (а) должно быть 0,46, (b) должно быть 110, (с) должно быть 12,0, (d) должно быть 3,95 и (е) должно быть 101

Таблица 15: Биохимическая характеристика Фактора IX

		FIXFc	rFIX	pdFIX
Гамма-карбоксилирование				
aa 1-23 (K1K2 пептид)	% 6 Gla	97,8	96,9	99,6
	% 5 Gla	2,2	3,1	0,4
	% 4 Gla	0	0	0
aa 24-43 (K3 пептид)	% 6 Gla	61,3	63,7	98,9
	% 5 Gla	26,3	30,9	1,1
	% 4 Gla	12,5	5,4	0
Общее Gla/mol, пептидная карта		11,5	11,6	12,0
Общее Gla/mol, AAA		11,3 ± 0,3	11,5 ± 0,3	(12)
Содержание пропептидов		не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
δ-гидроксилирование Asp 64		70%	49%	37%
Сульфатация Tyr 155		4%	5%	(>90%)
Фосфорилирование Ser 158		<10%	<10%	(>90%)
Ala 148/Thr 148		0/100%	100/0%	30/70%
Активированный FIX		<0,0125%	0,109 +/- 0,00185%	0,21 +/- 0,010%
FXIa активация		94,8 +/- 2,4%	96,6 +/- 1,8%	Не сделано

Таблица 16: Сводка терминальных полупериодов FIXFc и BENEFIX™ после однократной внутривенной дозы.

Виды	BENEFIX™	FIXFc
Нормальные мыши	12,3 ч	47,2 ± 4,8 ч
Дефицитные по FIX мыши	13,2 ч	46,2 ± 10,1 ч
FcRN KO мыши	16,5 ± 3,0 ч	16,9 ± 2,1 ч
FcRN Tg32b мыши	14,2 ± 2,9 ч	53,0 ± 6,6 ч
Крысы	5,8 ч	34,8 ± 5,3 ч
Дефицитные по FIX собаки	14-18 ч *	47,5 ч
Обезьяна	12,7 ч †	47,3± 9,1 ч

* Brinkhous et al, Blood, 1996; 88: 2603-2610

† McCarthy et al, 2002, Thromb Haemost, 2002; 87: 824-830

**Таблица 17. Сводка in vitro ROTEM® параметров для rFIXFc и BENEFIX™
впрыснутых в пулы цельной крови HemВ мышей**

	% нормальной активности	СТ (сек) (Среднее ± SD)	CFT (сек) (Среднее ± SD)	Альфа Угол (°) (Среднее ± SD)
rFIXFc (n=10 пулов)	0,074	2263 ± 209	1152 ± 170	24 ± 5
	0,74	1371 ± 82	459 ± 45	34 ± 5
	7,4	790,8 ± 30	226 ± 20	52 ± 2
BENEFIX™ (n=10 пулов)	0,1	2019 ± 178	732 ± 123	30 ± 3
	1	1090 ± 38	324 ± 33	43 ± 3
	10	551,1 ± 38	127 ± 10	67 ± 2

**Таблица 18. Медианная потеря крови после отрезания хвоста у HemВ мышей,
обработанных rFIXFc или BENEFIX™**

Доза (МЕ/кг)	Медианная потеря крови (мл)		
	rFIXFc (n=15/доза)	BENEFIX™ (n=15/доза)	Наполнитель (n=18)
720	0,101		
360	0,651	0,218	
240	0,298		
120	0,4567	0,564	
80	0,8474		
40	1,0097	0,918	
0			1,1586

**Таблица 19 . Ex vivo ROTEM® параметр у HemВ мышей, обработанных rFIXFc и
BENEFIX™**

	Время (час)	СТ (sec) (Среднее ± SD)	CFT (sec) (Среднее ± SD)	Альфа угол (степень) (Среднее ± SD)
100 МЕ/кг BENEFIX™ (n=4 мышь/време нную точку)	0,083	599 ± 23	174 ± 16	58 ± 2
	24	682 ± 49	184 ± 34	57 ± 5
	48	897 ± 114	310 ± 89	45 ± 7
	72	1141 ± 155	508 ± 123	32 ± 7
	96	1613 ± 181	605 ± 92	27 ± 3
50 МЕ/кг rFIXFc (n=8 мышь/време нную точку)	0,083	700 ± 18	213 ± 9	53 ± 1
	24	836 ± 31	261 ± 15	47 ± 2
	72	845 ± 38	285 ± 17	45 ± 2
	96	957 ± 30	296 ± 26	43 ± 2
	120	1014 ± 83	342 ± 50	42 ± 4
	168	1139 ± 65	408 ± 41	36 ± 3
	216	1366 ± 96	453 ± 48	34 ± 3

Таблица 20А. PK параметры rFIXFc и BENEFIX™ (200 МЕ/кг) после подкожной инъекции однократной дозы дефицитным по FIX мышам (антиген ИФА)

Соединение	Доза нг/кг	V/F мл/кг	Т _{1/2} ч	AUC _{INF} Ч*нг/ мл	Абсорбция HL Ч	Элиминация HL Ч	CL/F мл/Ч/кг	T _{max} Чг	C _{max} нг/мл	AUC/Д оза Ч.кг/мл:	C _{max} /Д оза г/мл	F %
BENEFIX	727273	3920	2,86	6397	1,96	23,9	114	10,6	148	0,00880	0,204	23,3
rFIXFc	327868 9	2071	0,896	14137 0	7,67	61,9	23,2	27,3	1178	0,0431	0,359	38,1

Таблица 20В. PK параметры rFIXFc и BENEFIX™ (200 МЕ/кг) после подкожной инъекции однократной дозы дефицитным по FIX мышам (антиген ИФА) (анализ aPTT активности)

Соединение	Доза нг/кг	V/F мл/кг	Т _{1/2} ч	AUC _{INF} Ч*нг/ мл	Абсорбция HL Ч	Элиминация HL Ч	CL/F мл/Ч/кг	T _{max} Чг	C _{max} нг/мл	AUC/Д оза Ч.кг/мл:	C _{max} /Д оза г/мл	F %
BENEFIX	207	54,8	0,631	93,9	7,01	17,2	2,20	16,0	2,04	0,454	9,86	18,9
rFIXFc	172	25,1	2,32	418	6,84	42,4	0,411	23,8	4,82	2,43	28,0	29,1

Таблица 21. PK и PD анализы rFIXFc и BENEFIX™ после однократной подкожной дозы дефицитным по FIX мышам.

	Анализ	AUC/Доза (Ч*кг/мл)	элим. полуперио д(Ч)	CL/F (мл/Ч/кг)/%	Tmax (Ч)	Стах/Доза (кг/мл)	F (%)
rFIXFc 200 ME/кг	Антиген	0,041	61,9	23,2	27,3	0,00035	38,1
BENEFIX™ 200 ME/кг	Антиген	0,0073	23,9	114	10,6	0,00017	23,3
Соотношение (rFIXFc/BENEFIX™)	Антиге н	5,62	2,59	0,20	2,58	2,05	1,63
rFIXFc 400 ME/кг	Антиген	0,042	50,9	23,7	18,3	0,00045	45,6
BENEFIX™ 400 ME/кг	Антиген	0,0089	20,2	113	8,13	0,00024	20,2
Соотношение (rFIXFc/BENEFIX™)	Антиге н	4,72	2,52	0,21	2,25	1,91	2,26
		AUC/Доза (Ч*кг/мл)	элим. полуперио д (Hr)	CL/F (мл/Ч/кг)/%	Tmax (ч)	Стах/Доза (кг/мл)	F (%)
rFIXFc 200 ME/кг	Активно сть	0,021	42,4	41,1	23,8	0,00024	29,1
BENEFIX™ 200 ME/кг	Активно сть	0,0047	17,2	220	16,0	0,00010	18,9
Соотношение (rFIXFc/BENEFIX™)	Активн ость	4,47	2,46	0,19	1,49	2,40	1,54
rFIXFc 400 ME/кг	Активно сть	0,028	40,3	35,6	15,9	0,00037	39,2
BENEFIX™ 400 ME/кг	Активно сть	0,0052	15,6	193	18,1	0,00010	15,5
Соотношение (rFIXFc/BENEFIX™)	Активн ость	5,38	2,58	0,18	0,88	3,70	2,53

Таблица 22. РК параметры rFIXFc (50 МЕ/кг) после подкожной инъекции однократной дозы яванским макакам.

Группа	Животное_ID	V/F (мл/кг)	AUC (Ч*нг/мл)	Абсорбция HL (Ч)	Конечный HL (Ч)	CL/F (мл/Ч/кг)	Tmax (Ч)	Cmax (нг/мл)	AUC/D (Ч*кг/мл)	F(%)
50 МЕ/кг rFIXFc	5C4	545	109000	8,42	50,2	7,53	26,1	1050	0,133	43,7
	C37716	975	108000	6,4	89	7,6	26,2	685	0,132	43,3
	C41440	622	82500	8,54	43,4	9,93	24,9	885	0,101	33,1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Среднее	714	99800	7,79	60,9	8,35	25,7	873	0,122	40,1
	SD	229	14900	1,2	24,6	1,37	0,685	182	0,0183	6,03
	SE	132	8630	0,695	14,2	0,79	0,396	105	0,0106	3,48
	Геометрическое среднее	691	99000	7,72	57,9	8,28	25,7	860	0,121	39,7
	CV% Геометрическое среднее	31,2	15,8	16,4	39,4	15,8	2,68	21,7	15,9	15,9

Таблица 23. РК параметры rFIXFc (100 МЕ/кг) после подкожной инъекции однократной дозы яванским макакам.

Группа	Животное_ID	V/F (мл/кг)	AUC (Ч*нг/мл)	Абсорбция HL (Ч)	Конечный HL (Ч)	CL/F (мл/Ч/кг)	Tmax (Ч)	Cmax (нг/мл)	AUC/D (Ч*кг/мл)	F(%)
100 МЕ/кг rFIXFc	29109	1630	69800	11,4	48,1	23,5	31	644	0,0426	14,0
	605097	561	207000	5,12	49,2	7,9	18,6	2250	0,126	41,5
	C35785	387	238000	6,37	39	6,89	19,9	2970	0,145	47,8
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Среднее	858	172000	7,62	45,4	12,8	23,2	1950	0,105	34,4
	SD	671	89600	3,31	5,58	9,3	6,79	1190	0,0546	18,0
	SE	388	51700	1,91	3,22	5,37	3,92	687	0,0315	10,4
	Геометрическое среднее	707	151000	7,18	45,2	10,9	22,6	1630	0,0921	30,3
	CV% Геометрическое среднее	86,2	75,5	43,1	12,8	75,5	28,2	96,9	75,5	75,5

Таблица 24. PK параметры rFIXFc (200 МЕ/кг) после подкожной инъекции однократной дозы яванским макакам.

Группа	Животное_ID	V/F (мл/кг)	AUC (Ч*нг/мл)	Абсорбция HL (Ч)	Конечный HL (Ч)	CL/F (мл/Ч/кг)	Tmax (Ч)	Cmax (нг/мл)	AUC/D (Ч*кг/мл)	F(%)
100 МЕ/кг rFIXFc	50883	855	408000	3,36	73,7	8,03	15,7	3310	0,124	40,9
	C31129	461	415000	6,42	40,4	7,91	20,2	5030	0,127	41,6
	C41410	147	262000	11,5	32,6	3,12	26,7	3160	0,0799	26,3
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Среднее	487	362000	7,08	48,9	6,36	20,9	3830	0,110	36,3
	SD	354	86100	4,08	21,8	2,8	5,51	1040	0,0263	8,67
	SE	205	49700	2,36	12,6	1,62	3,18	598	0,0152	5,00
	Геометрическое среднее	387	354000	6,27	46	5,83	20,4	3750	0,108	35,5
	CV% Геометрическое среднее	110	26,4	67,6	44,2	58,3	27	25,9	26,5	26,5

Таблица 25. РК анализ rFIXFc после однократной подкожной дозы яванским макакам.

rFIXFc (МЕ/кг)		AUC (Ч*нг/мл)	Абс. полупер иод (Ч)	Элим. полупер иод (Hr)	CL/F (мл/Ч/кг)/%	Tmax (Ч)	Cmax (нг/мл)	F(%)
50	Геом. средн ее	99000	7,72	57,9	8,28	25,7	860	39,7
	CV% Гео. Mn	15,8	16,4	39,4	15,8	2,68	21,7	15,9
100	Геом. средн ее	221959	5,71	43,8	7,38	19,2	2585	44,5
	CV% Гео. Mn	9,89	15,5	16,5	9,70	4,78	19,8	10,0
200	Геом. средн ее	354000	6,27	46	5,83	20,4	3750	35,5
	CV% Геом. Ср.	26,4	67,6	44,2	58,3	27	25,9	26,5

Биодоступность в диапазоне от 35,5 до 44,5% для rFIXFc
Полупериод элиминации в диапазоне от 43,8 до 57,9 часов для rFIXFc

Таблица 26. Рекомендации по дозировке для rFIXFc терапии Гемофилии В

Тип кровотечения	Требуемая концентрация фактора IX (%)	Частота дозировки (часы)
Слабое		
Носовое кровотечение		
Гемартрозы, неосложненные	20-30	48
Поверхностное мышечное	20-30	48
Поверхностное мягкой ткани	20-30	48
Среднее		
Носовое кровотечение		
Внутримышечное с рассечением	25-50	48
Мягкая ткань с рассечением	25-50	48
Слизистые мембраны	25-50	48
Удаление зуба	25-50	48
Гематурия	25-50	48
Гемартрозы, с ограниченной подвижностью	40-80	48
Сильное		
Носовое кровотечение	50-100	24-48
Глоточное	50-100	24-48
Заглоточное	50-100	24-48
Забрюшинное	50-100	24-48
Хирургия	50-100	24-48
CNS	50-100	24-48

Пациент должен консультироваться со своим лечащим врачом, но должен принимать только 1 следующую дозу по меньшей мере через 24-48 часов после первой дозы.

Таблицы 27А и 27В. Сравнение данных с использования расчетов в (А) Примере 1 и (В) Примере 11.

А

Доза (МЕ/кг)	Параметр (среднее±SD)										
	n	C _{max} (МЕ/дл)	AUC _{INF} (ч·МЕ/дл)	CL (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	MRT (ч)	T1/2α(ч)	T1/2β (ч)	Постепенное увеличение концентрации (МЕ/дл на МЕ/кг)*	C _{168h} (МЕ/дл) [†]	Время при 1% выше базового уровня (День) [‡]
25	1	19,9	753	3,62	275	76,0	1,20	54,0	0,77	1,09	7,28
50	5	41,6±8,97 /8,98	1630±750	3,77±1,12	264±77,6	71,7±13,0	1,79±1,19	52,1±10,4	0,86±0,22	2,23±1,40	9,29±1,98
100	5	98,2±8,21 /8,23	3930±893	2,89±0,615	179±31,1	62,8±8,82	9,99±4,99	52,5±10,1	1,02±0,11	4,38±1,53	11,6±1,97
25-100	11	NA [§]	NA [§]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA [§]	NA [§]

В

Доза (МЕ/кг)	Параметр (среднее±SD) (Диапазон)										
	n	C _{max} (МЕ/дл)	AUC _{INF} (ч·МЕ/дл)	CL (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	MRT (ч)	T1/2 α (ч)	T1/2 β (ч)	Постепенно е увеличение концентрац ии (МЕ/дл per ME/кг)*	C _{168h} (МЕ/дл) [†]	Время при 1% выше базового уровня (День) [‡]
25	1	20,4	766	3,56	271	76,2	0,61	53,5	0,77	1,11	7,3
50	5	47,5±12,8 (33,0- 61,1)	1700±550 (1300- 2660)	3,44±0,84 (2,05-4,18)	262±55,4 (163-296)	76,8±6,7 (67,9-85,9)	3,4±3,4 (0,13- 8,72)	57,5±8,2 (47,9-67,2)	0,87±0,21 (0,63-1,12)	2,46 ± 0,89 (1,63-3,92)	10,1 ± 1,5 (8,4-12,3)
100	5	98,5±7,9 (90,8- 110)	4020±986 (3090- 5130)	2,84±0,66 (2,13-3,55)	183±27,9 (162-221)	65,9±10,3 (53,2-76,5)	10,3±5,6 (3,97- 16,6)	56,5±14,1 (42,4-74,5)	1,02±0,11 (0,89-1,18)	4,65 ± 1,73 (3,08-6,85)	12,3 ± 2,5 (9,9-15,0)
25-100	11	NA [§]	NA [§]	3,18 ± 0,78 (2,05-4,18)	227 ± 58,6 (162-296)	71,8 ± 10,0 (53,2-85,9)	NA [§]	56,7 ± 10,9 (42,4-74,5)	0,93 ± 0,18 (0,63-1,18)	NA [§]	NA [§]

Представленные результаты являются средним ± SD с диапазоном, указанным в скобках

C_{max} показывает максимальную концентрацию; AUC_{INF}, область под кривой (нулевое время, экстраполированное к времени на бесконечности); CL, клиренс; V_{ss}, объем распределения в стабильном состоянии; MRT, среднее время удержания; T1/2 α , полупериод распределения; T1/2 β , полупериод элиминации; NA, не применимо

* Повышение концентрации было рассчитано с использованием наблюдаемого C_{max} с вычетом значения базового уровня перед лечением и разделенного на дозу

[†] Плазматическая FIX активность выше базового уровня при 168 часах (7 дней) после дозы

[‡] Модель-прогнозируемое время после дозы, когда FIX активность уменьшается до 1 МЕ/дл выше базового уровня пациента

[§] Данные не применимы, поскольку параметры не являются дозозависимыми, таким образом среднее и SD значения не были рассчитаны по различным дозовым группам

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения кровотечения при необходимости, включающий внутривенное введение человеку с гемофилией В дозы от примерно 25 МЕ/кг до примерно 100 МЕ/кг химерного полипептида фактора IX (FIX), содержащего FIX человека с аминокислотной последовательностью, идентичной аминокислотам 1-415 последовательности SEQ ID NO:2, и партнер связывания FcRn (BP FcRn), где FcRn BP представляет собой Fc человека или альбумин человека.

2. Способ по п.1, где уровень FIX в плазме человека составляет от примерно 30 МЕ/дл до примерно 60 МЕ/дл после введения дозы химерного полипептида FIX.

3. Способ по п.1, где уровень FIX в плазме человека составляет от примерно 80 МЕ/дл до примерно 100 МЕ/дл после введения дозы химерного полипептида FIX.

4. Способ по п.1, где уровень FIX в плазме человека составляет от примерно 20% до примерно 50% нормы после введения дозы химерного полипептида FIX.

5. Способ по п.1, где уровень FIX в плазме человека составляет от примерно 50% до примерно 100% нормы после введения дозы химерного полипептида FIX.

6. Способ по любому из пп.2-5, где уровень FIX в плазме измеряют через 8-12 часов после введения дозы химерного полипептида FIX.

7. Способ по п.1, где доза составляет от 50 МЕ/кг до 60 МЕ/кг, от 70 МЕ/кг до 80 МЕ/кг или от 90 МЕ/кг до 100 МЕ/кг.

8. Способ по п.1, где химерный полипептид FIX вводят с интервалом дозирования примерно 24-48 часов между двумя дозами.

9. Способ по п.1, где химерный полипептид FIX вводят с интервалом дозирования около 7 дней между двумя дозами.

10. Способ по п.1, где FcRn BP представляет собой Fc человека.

11. Способ по п.10, где Fc человека содержит аминокислоты 1-227 последовательности SEQ ID NO: 4.

12. Способ по п.1, где FcRn BP представляет собой альбумин человека.

13. Способ по п.1, где химерный полипептид дополнительно содержит линкер, соединяющий FIX человека и Fc человека или альбумин человека.

14. Способ по п.1, где человек нуждается в контроле кровотечения, связанного с хирургическим вмешательством.

15. Способ по п.14, где хирургическое вмешательство представляет собой малое хирургическое вмешательство, обширное хирургическое вмешательство, удаление зуба, тонзиллэктомию, сечение паховой грыжи, синовэктомию, полную замену коленного

сустава, краниотомию, остеосинтез, хирургию травм, внутричерепную операцию, внутрибрюшную операцию, внутригрудную операцию или операция по замене суставов.

16. Способ по п.14, где человеку предстоит обширное хирургическое вмешательство.

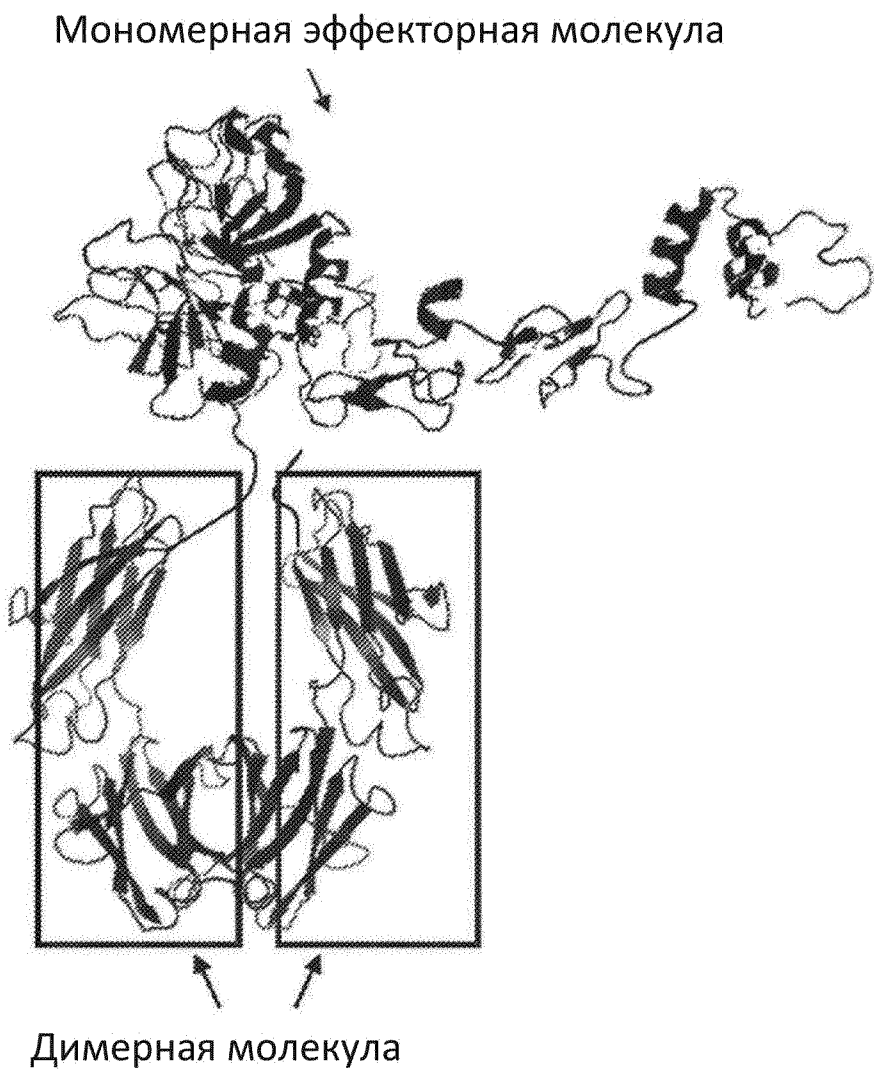
17. Способ по п.14, где человеку проводят обширное хирургическое вмешательство.

18. Способ по п.14, где человек перенес обширное хирургическое вмешательство.

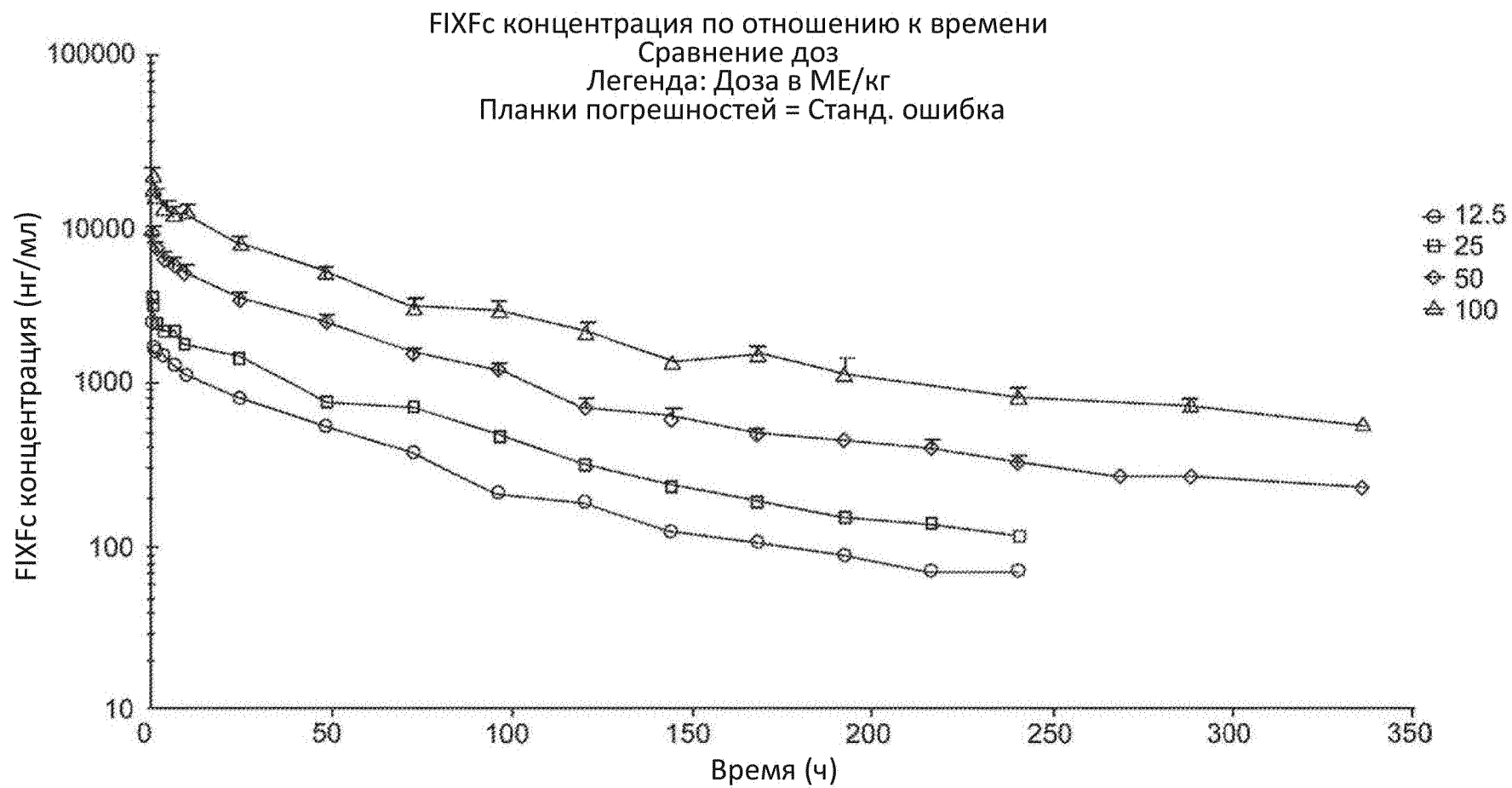
19. Способ по п.17, где обширное хирургическое вмешательство представляет собой ортопедическую операцию, обширную операцию полости рта, урологическую операцию или операцию по поводу грыжи.

20. Способ по п.1, где у человека имеется гемартроз, мышечное кровотечение, ротовое кровотечение, геморрагию, кровоизлияние в мышцу, ротовое кровоизлияние, травму, травму головы, желудочно-кишечное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, внутрибрюшное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, перелом кости, кровотечение центральной нервной системы, кровотечение в заглоточном пространстве, кровотечение в забрюшинном пространстве или кровотечение в подвздошно-поясничной оболочке.

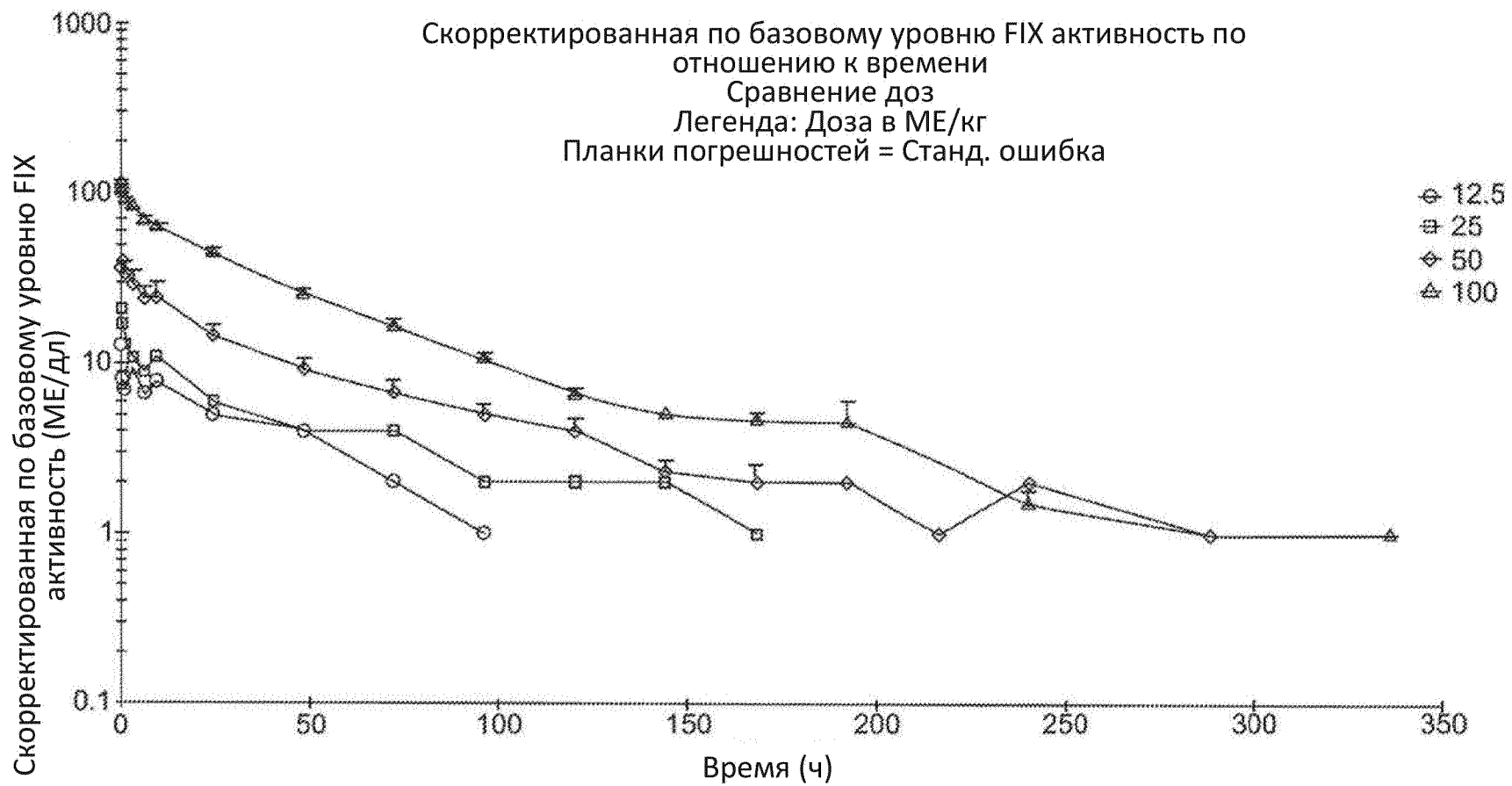
По доверенности



Фиг. 1

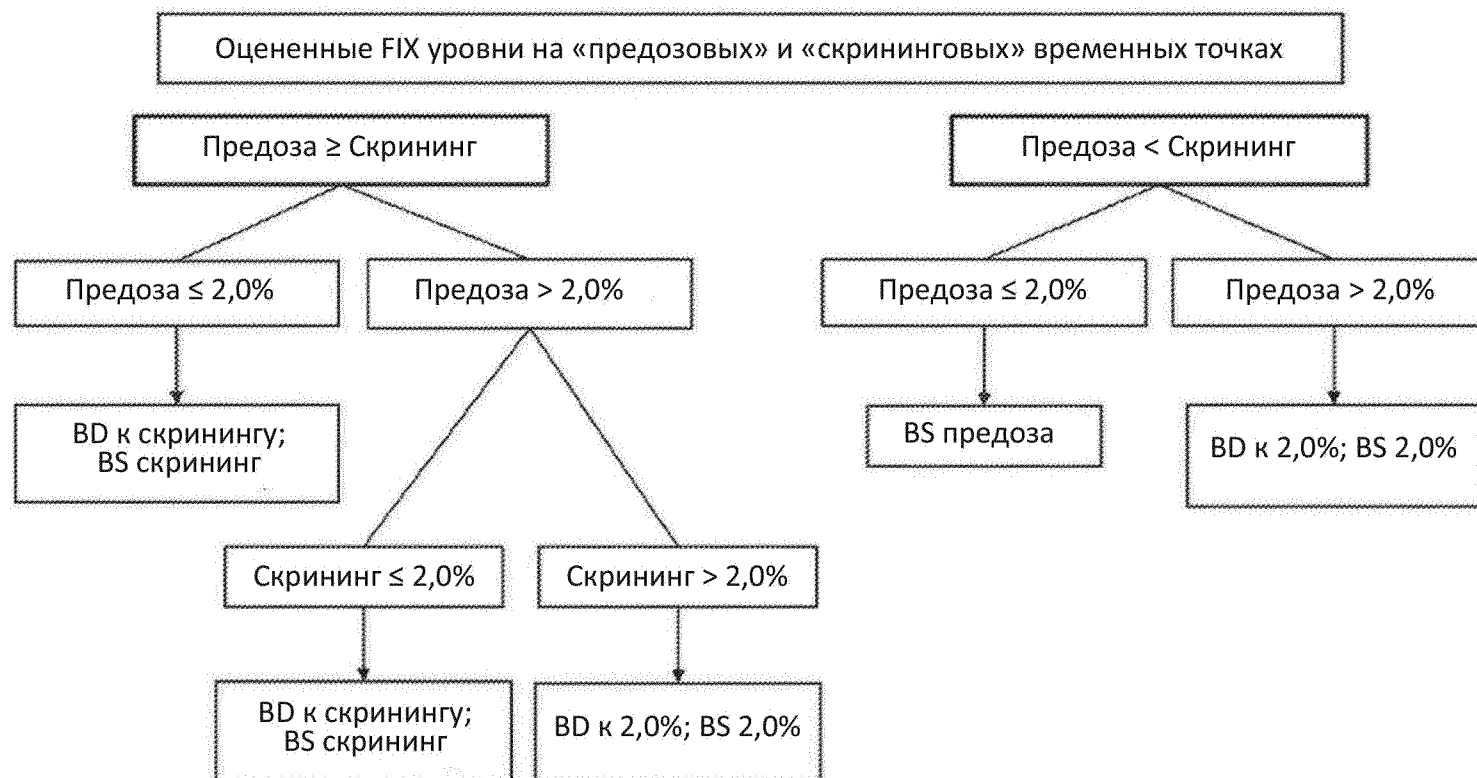


Фиг. 2



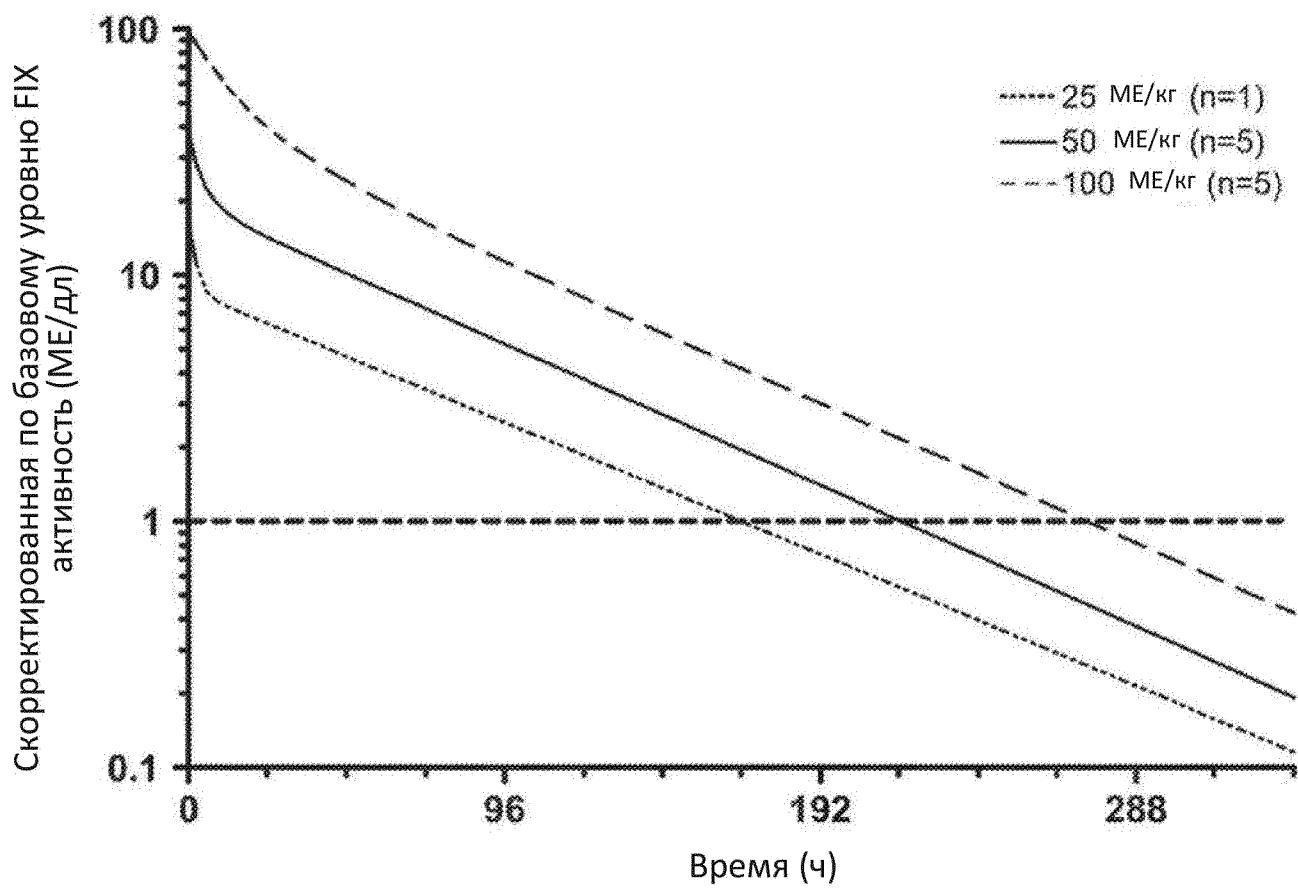
Фиг. 3

Дерево решений вычитания базового уровня (BS)

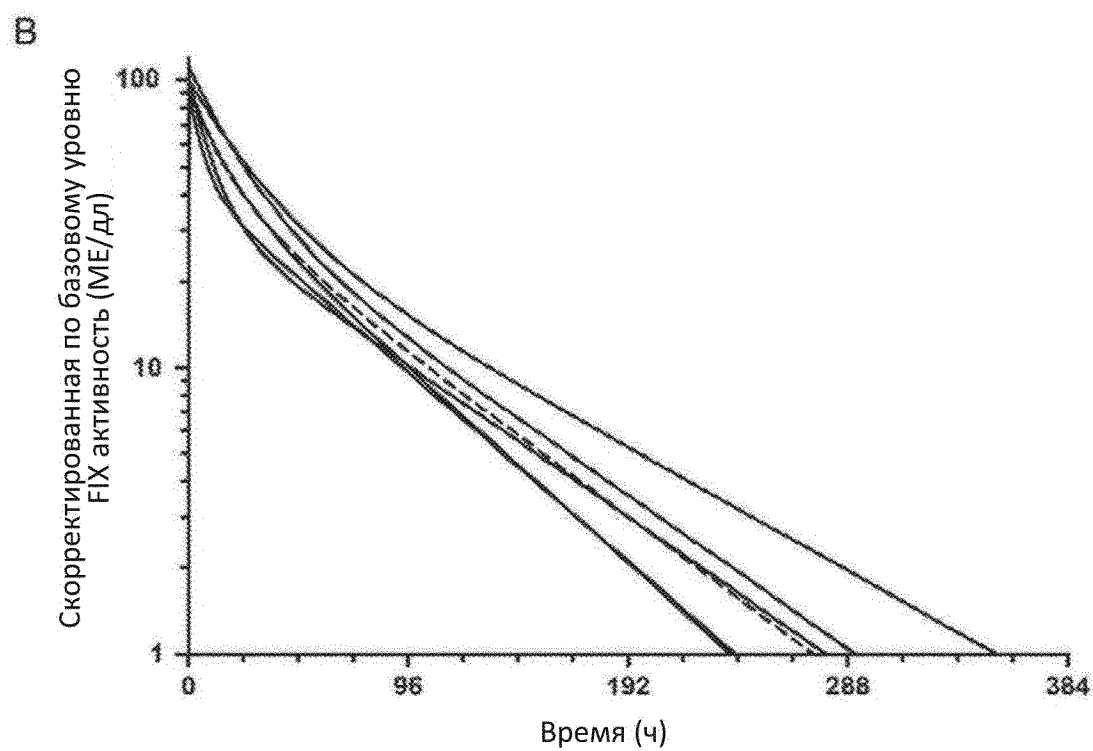
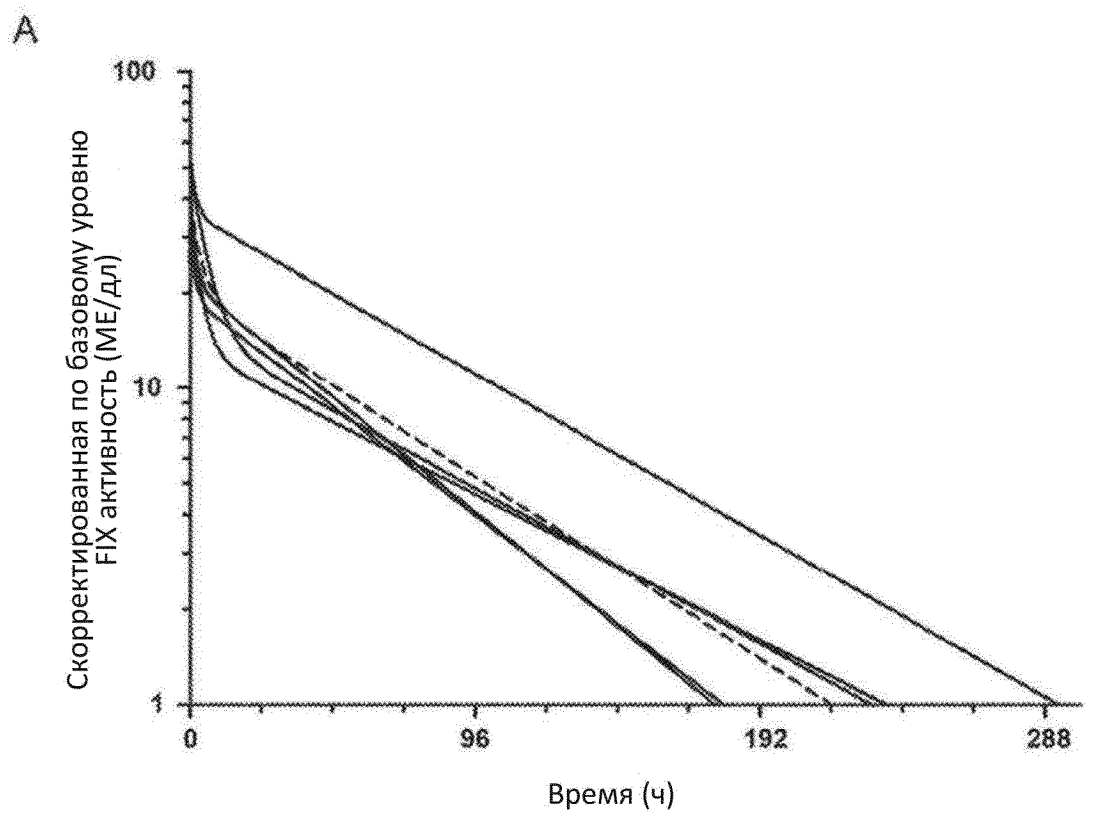


BS = вычитание базового уровня
BD = сведение к базовому уровню с использованием значения периода полувыведения состава FIX (напр., 18 ч)

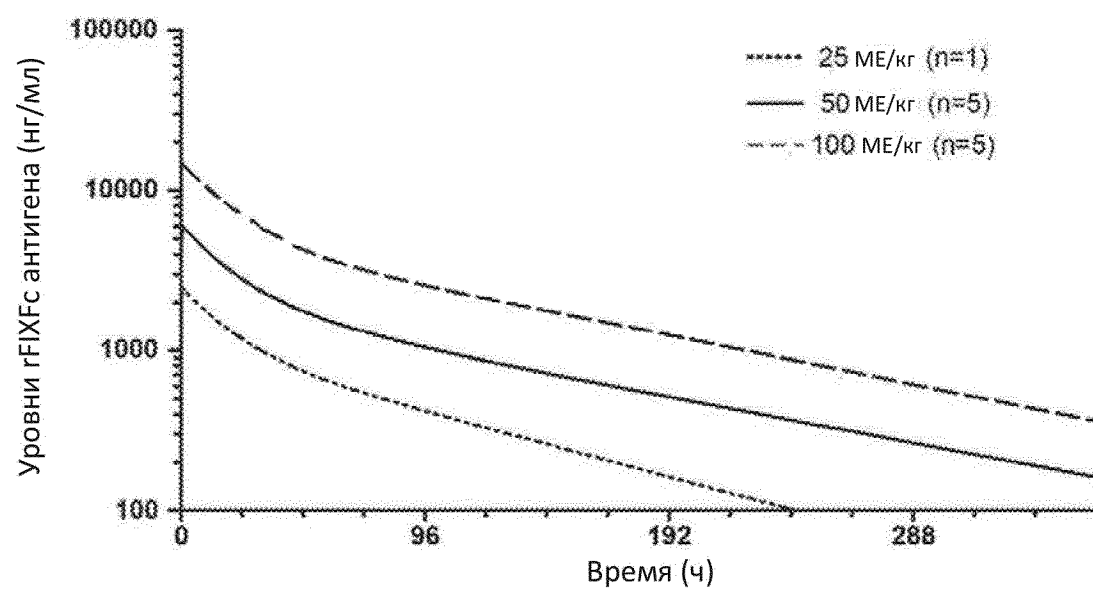
Фиг. 4



Фиг. 5

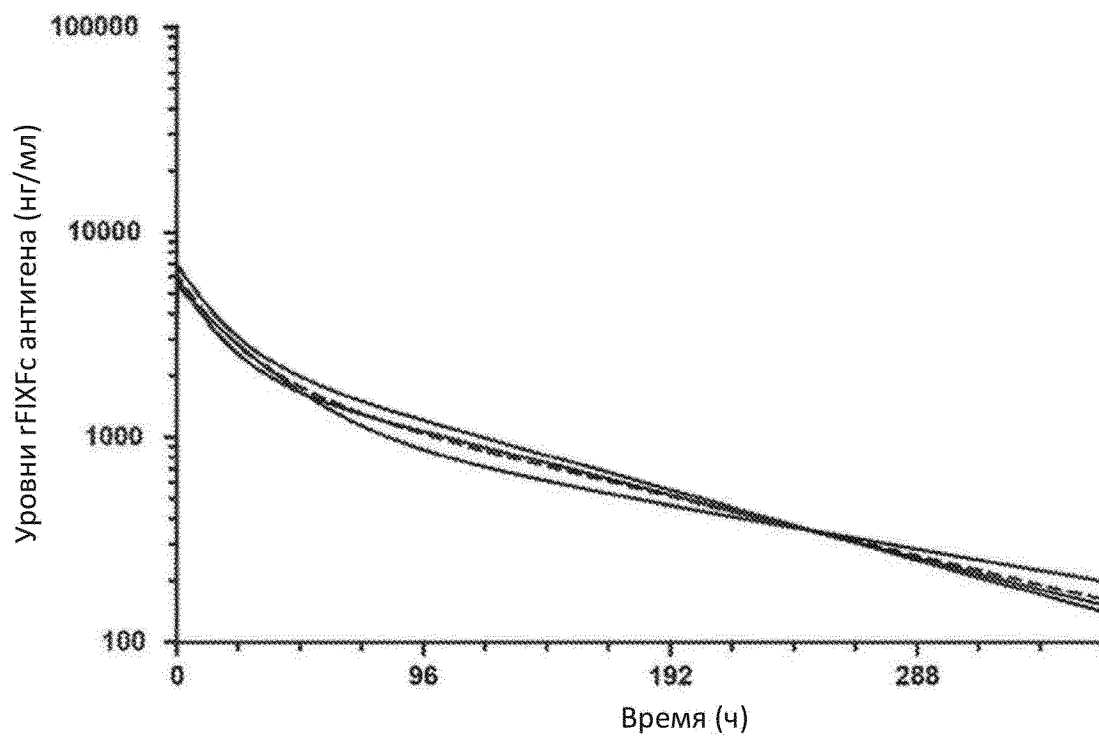


Фиг. 6

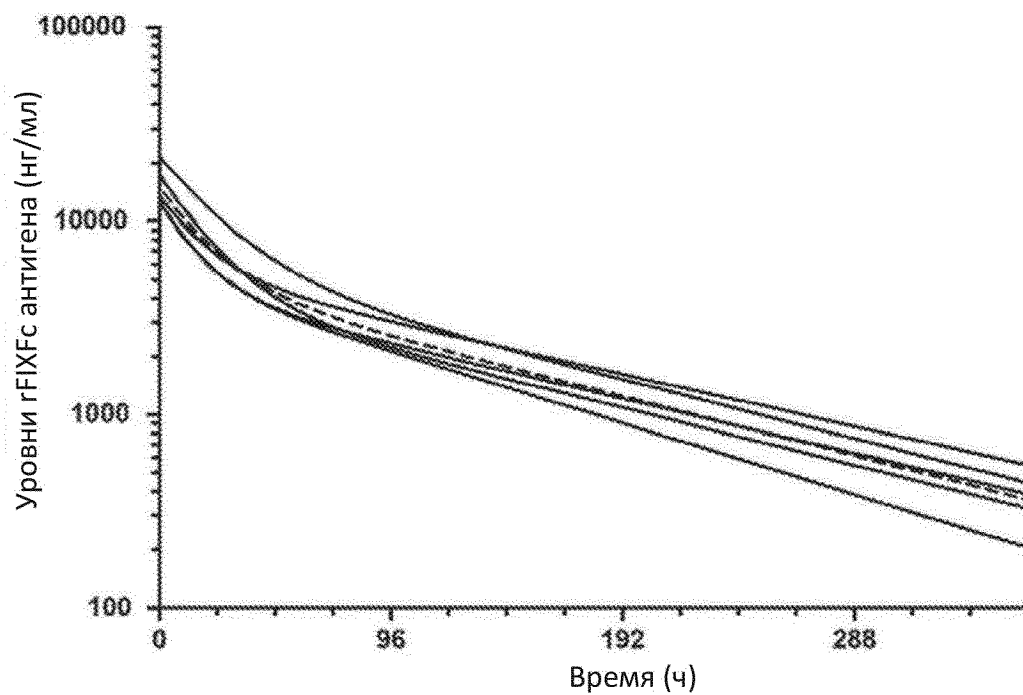


Фиг. 7

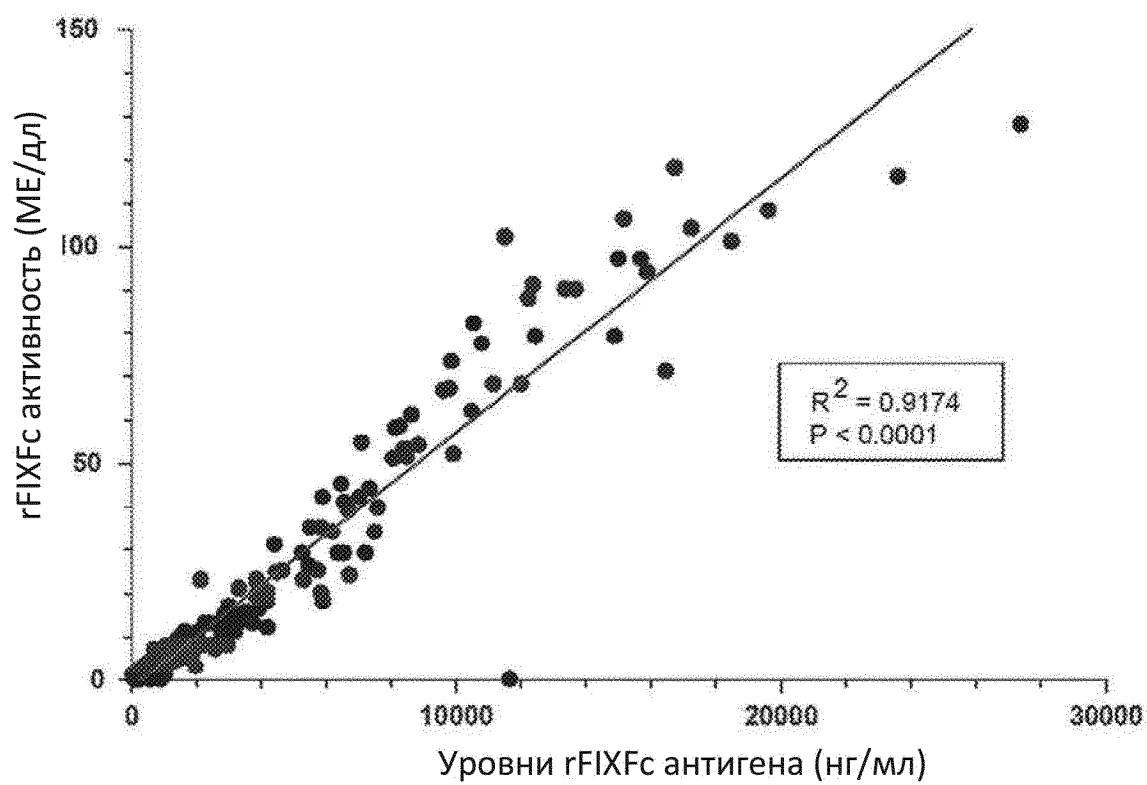
A



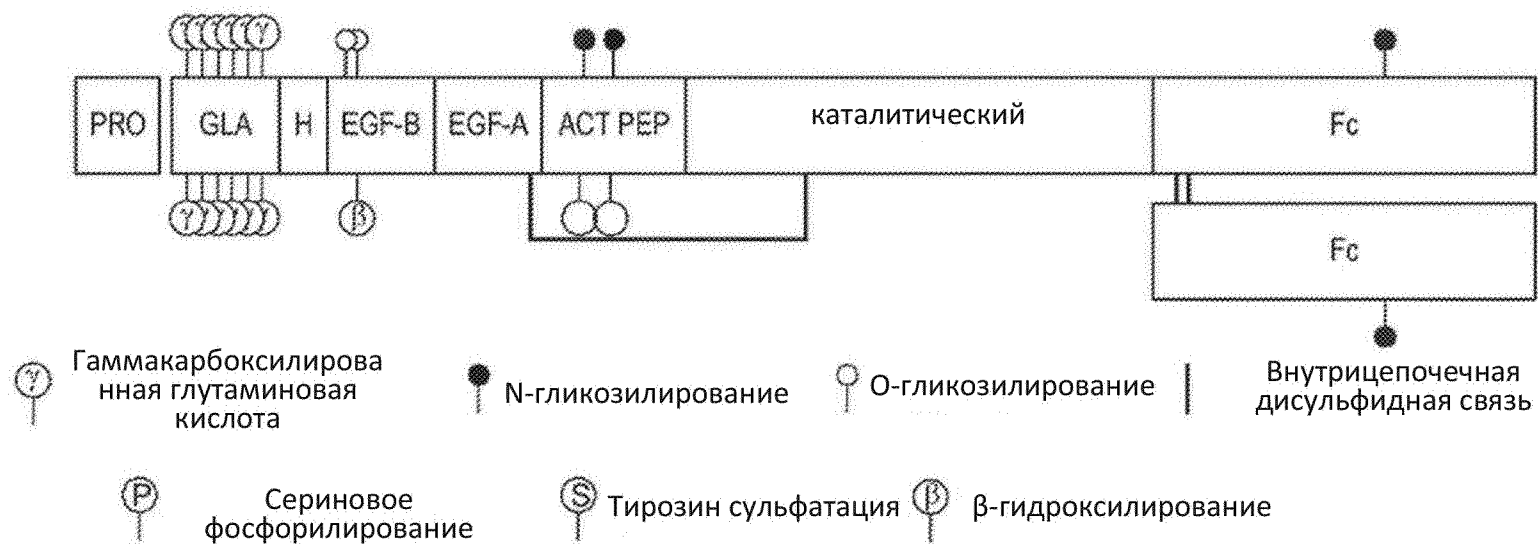
B



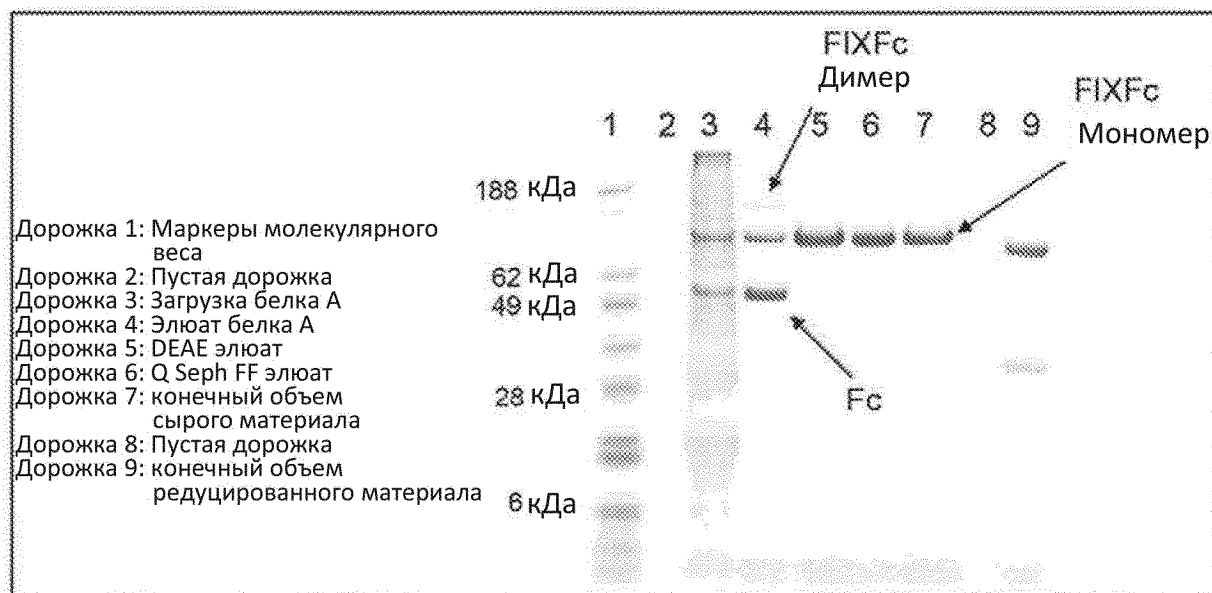
Фиг. 8



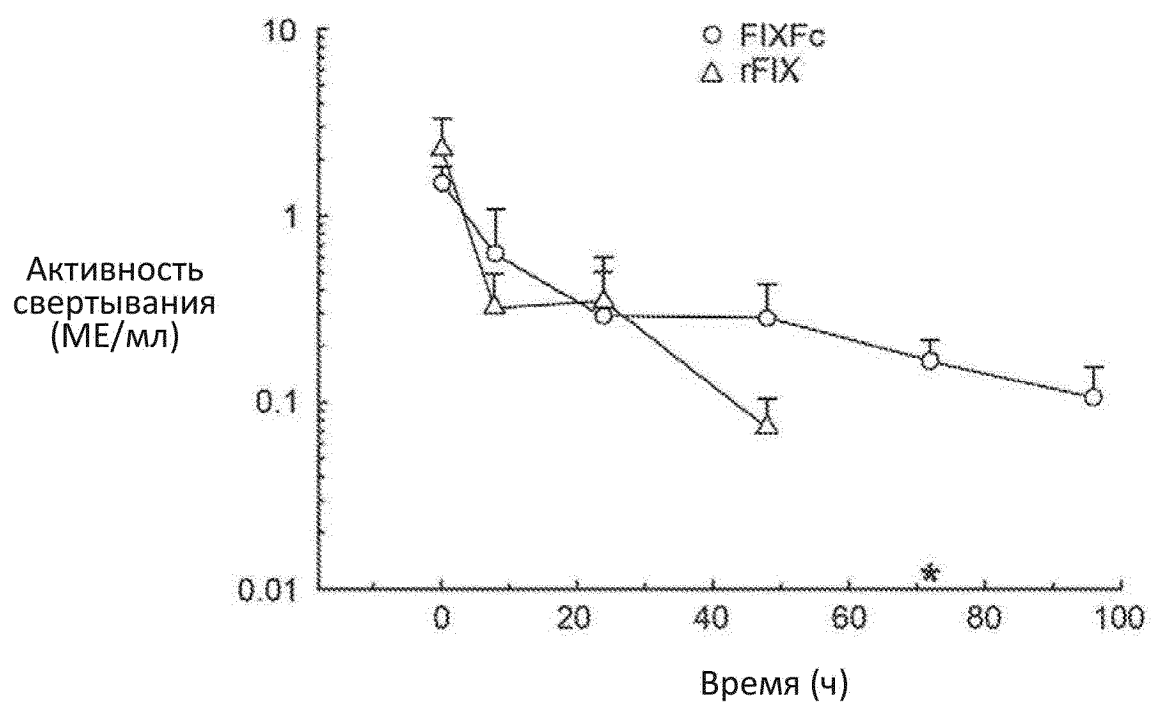
Фиг. 9



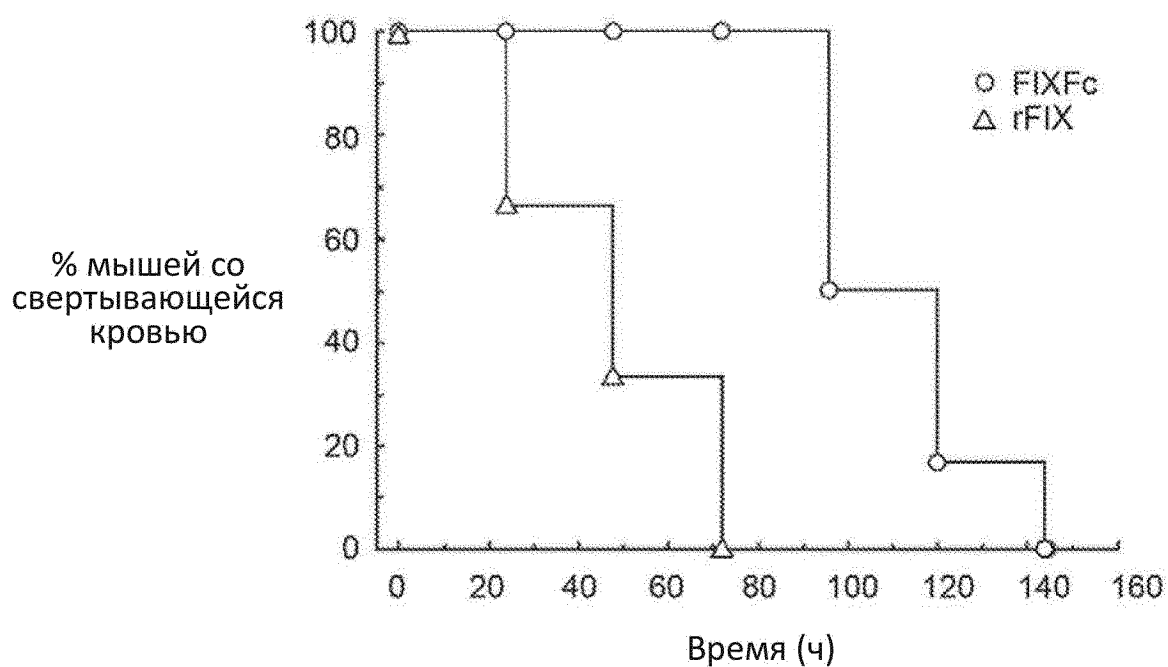
Фиг. 10



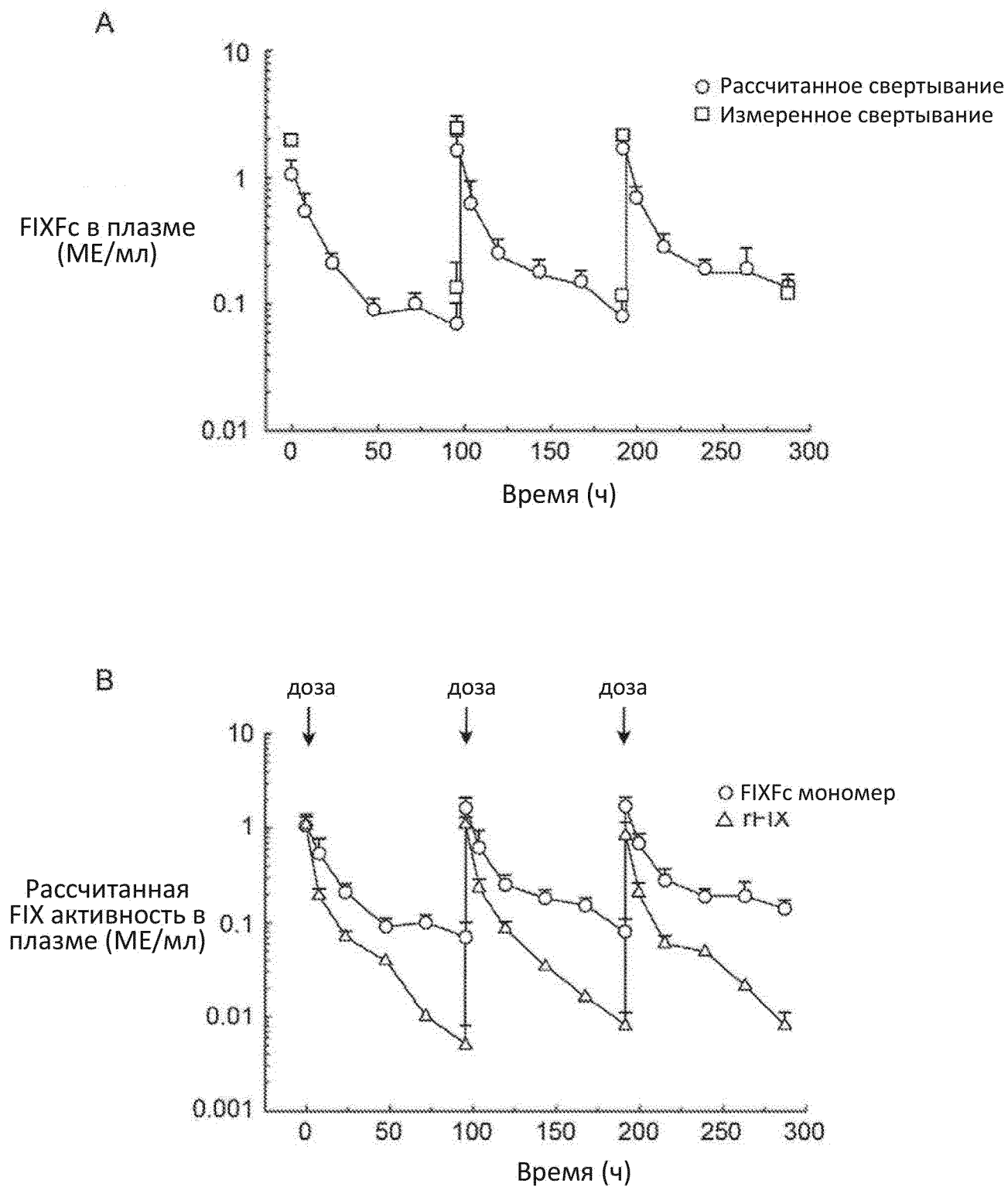
Фиг. 11



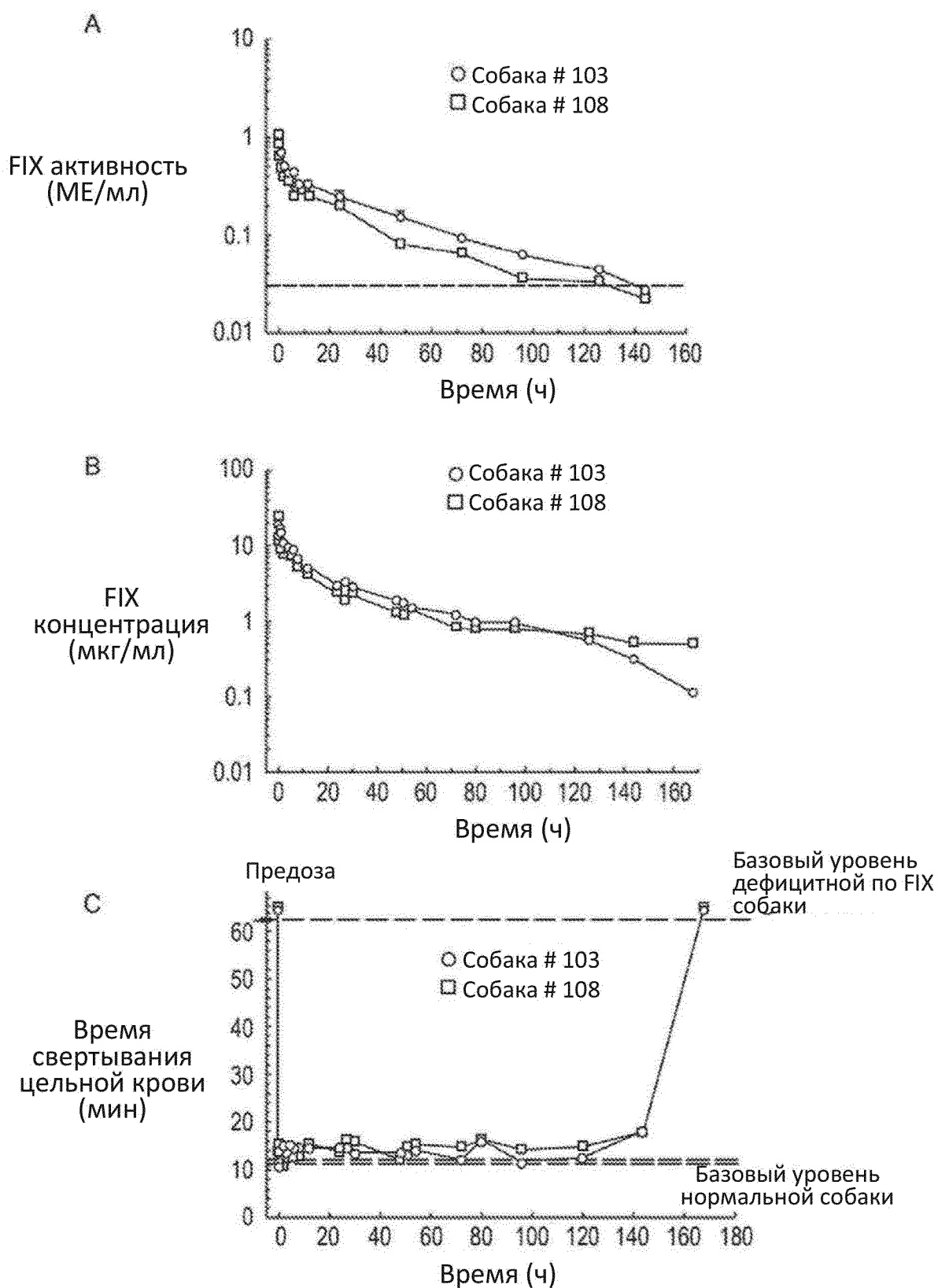
Фиг. 12



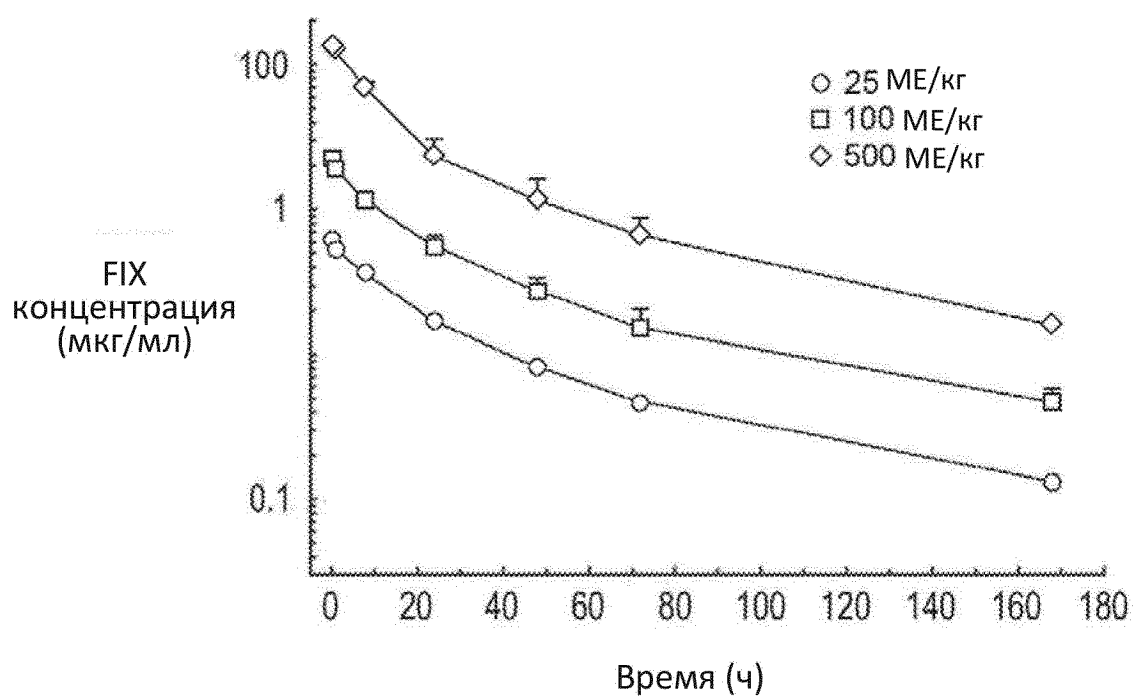
Фиг. 13



Фиг. 14

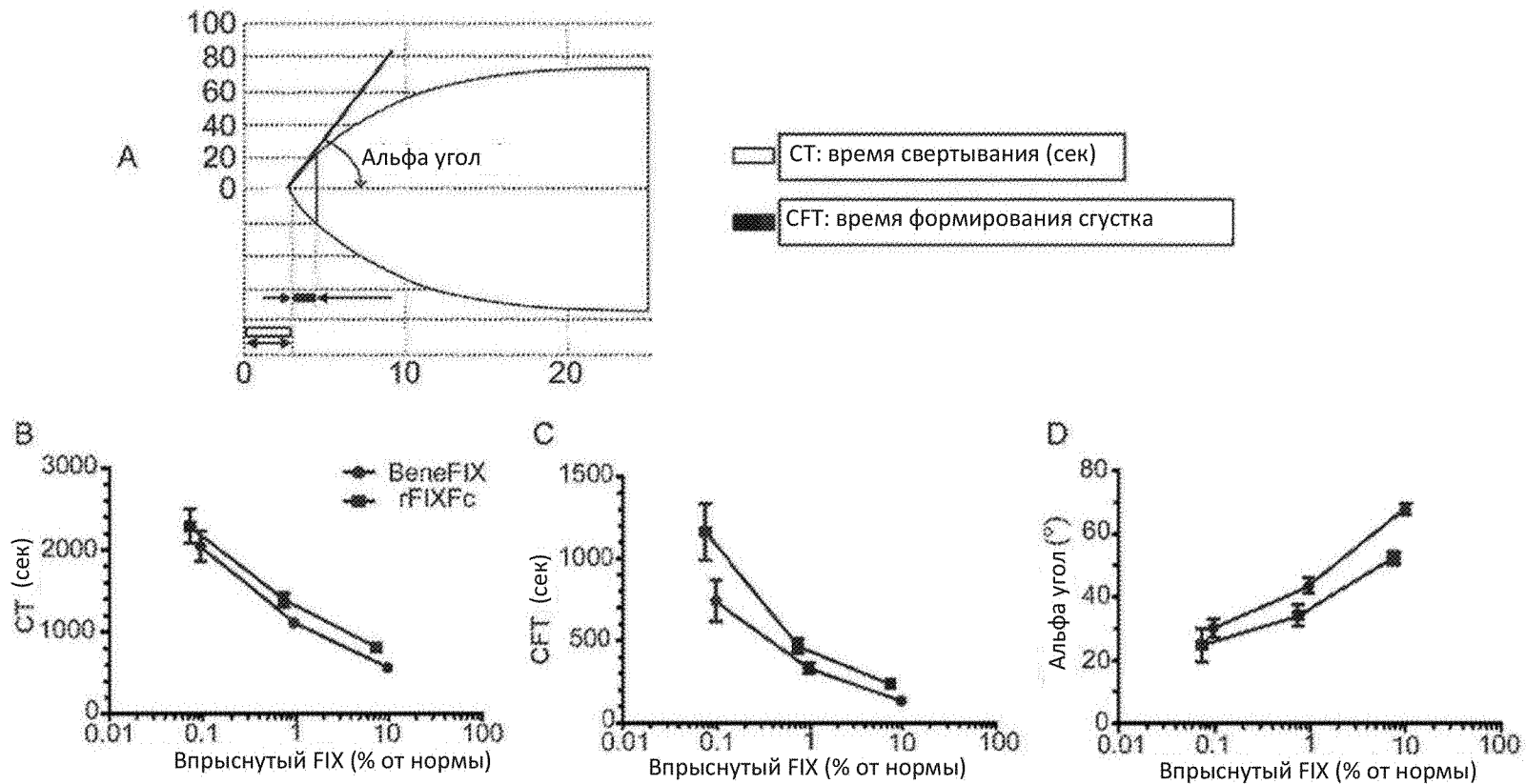


Фиг. 15

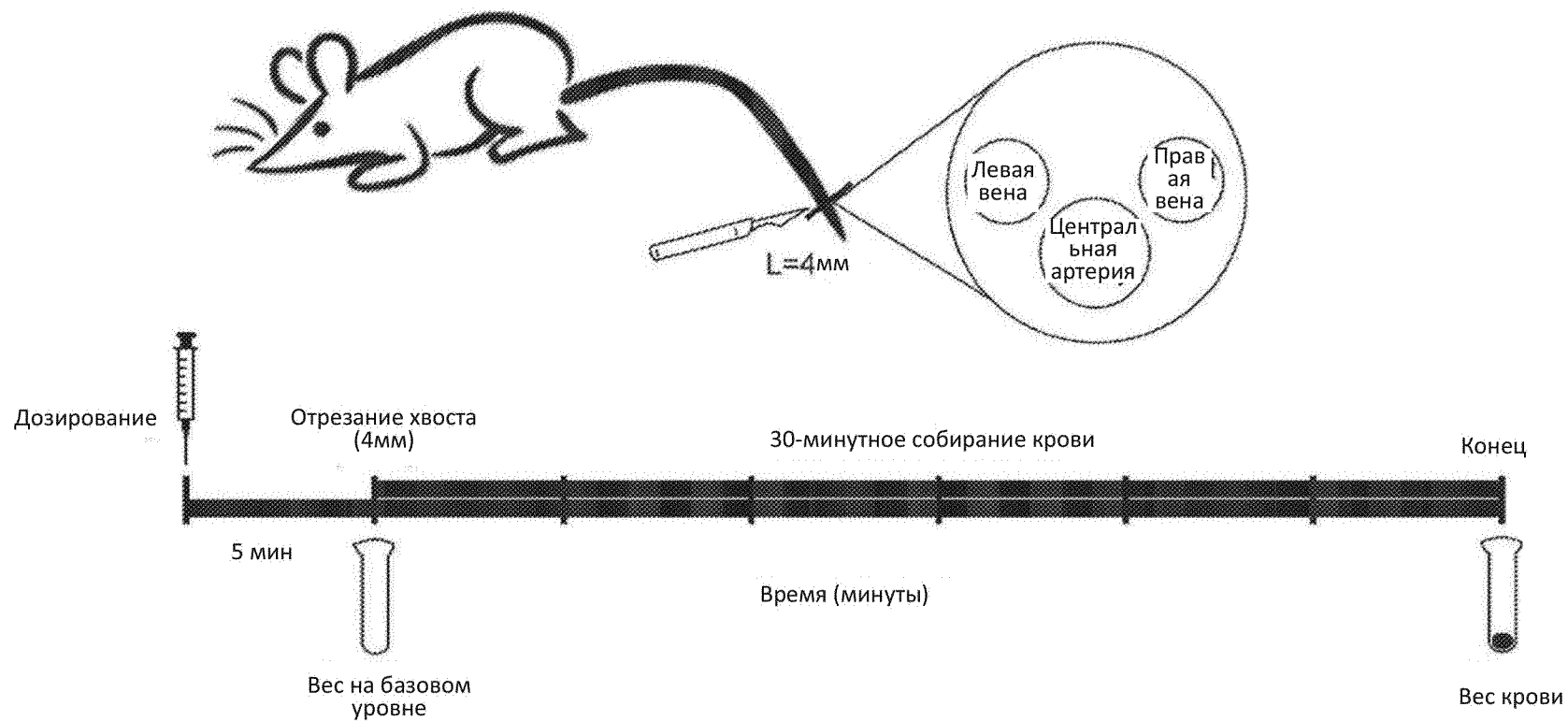


Фиг. 16

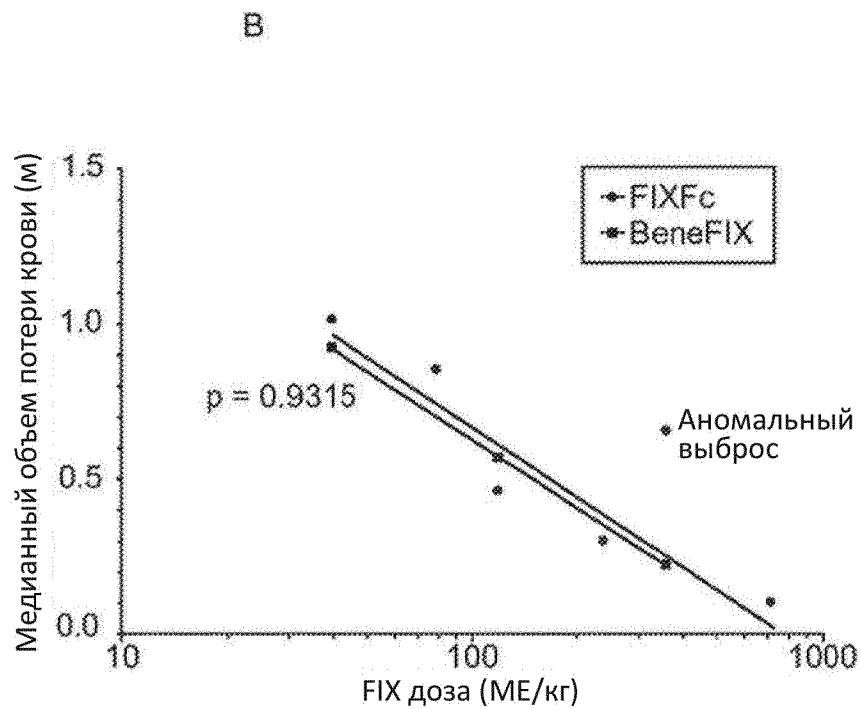
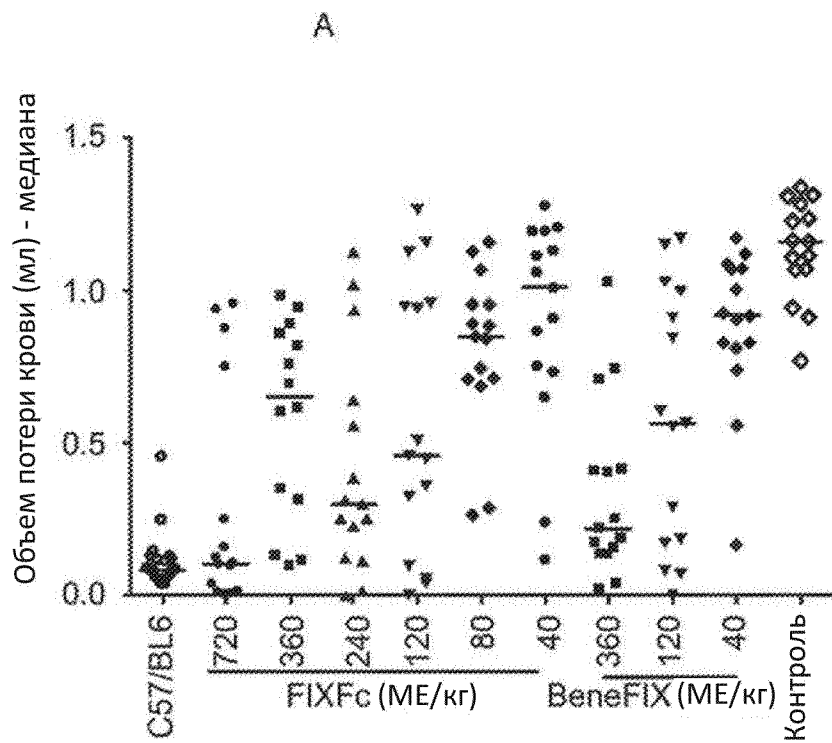
Параметры ROTEM



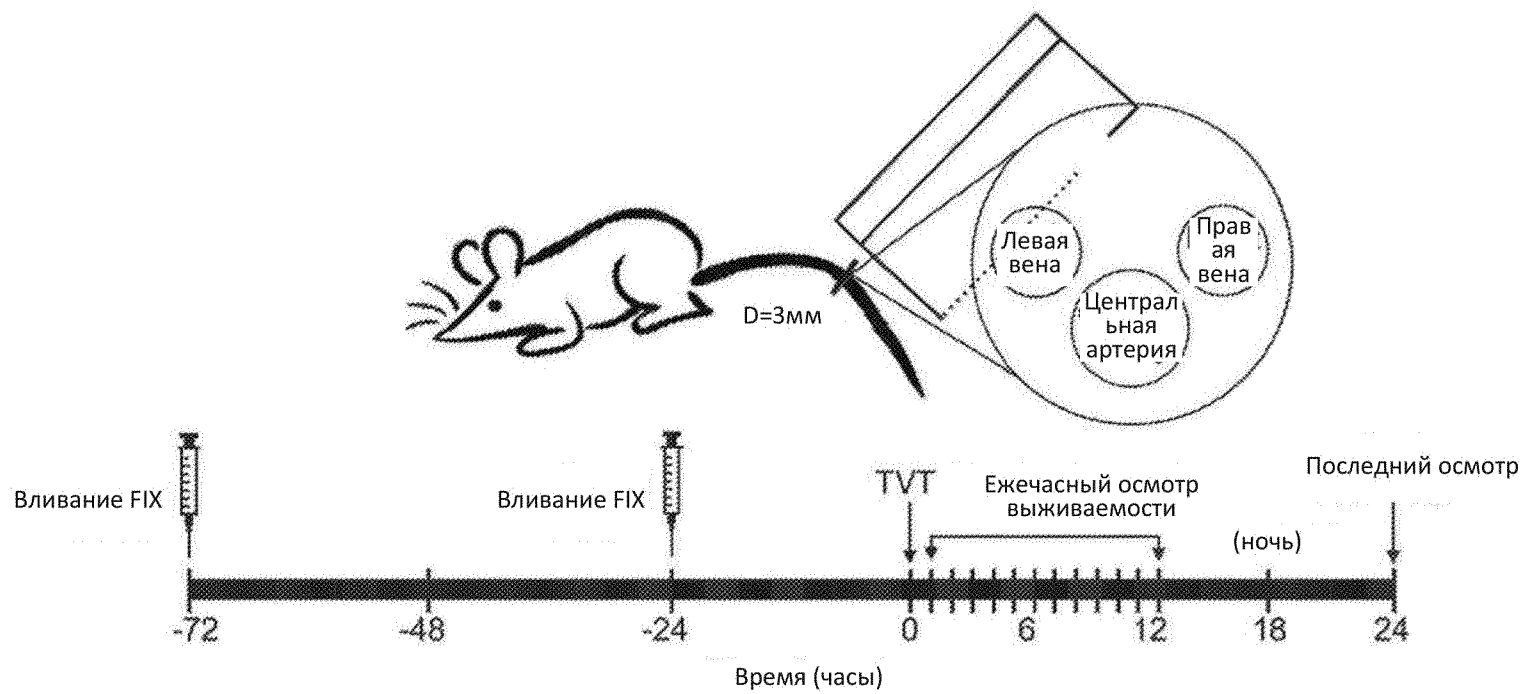
Фиг. 17



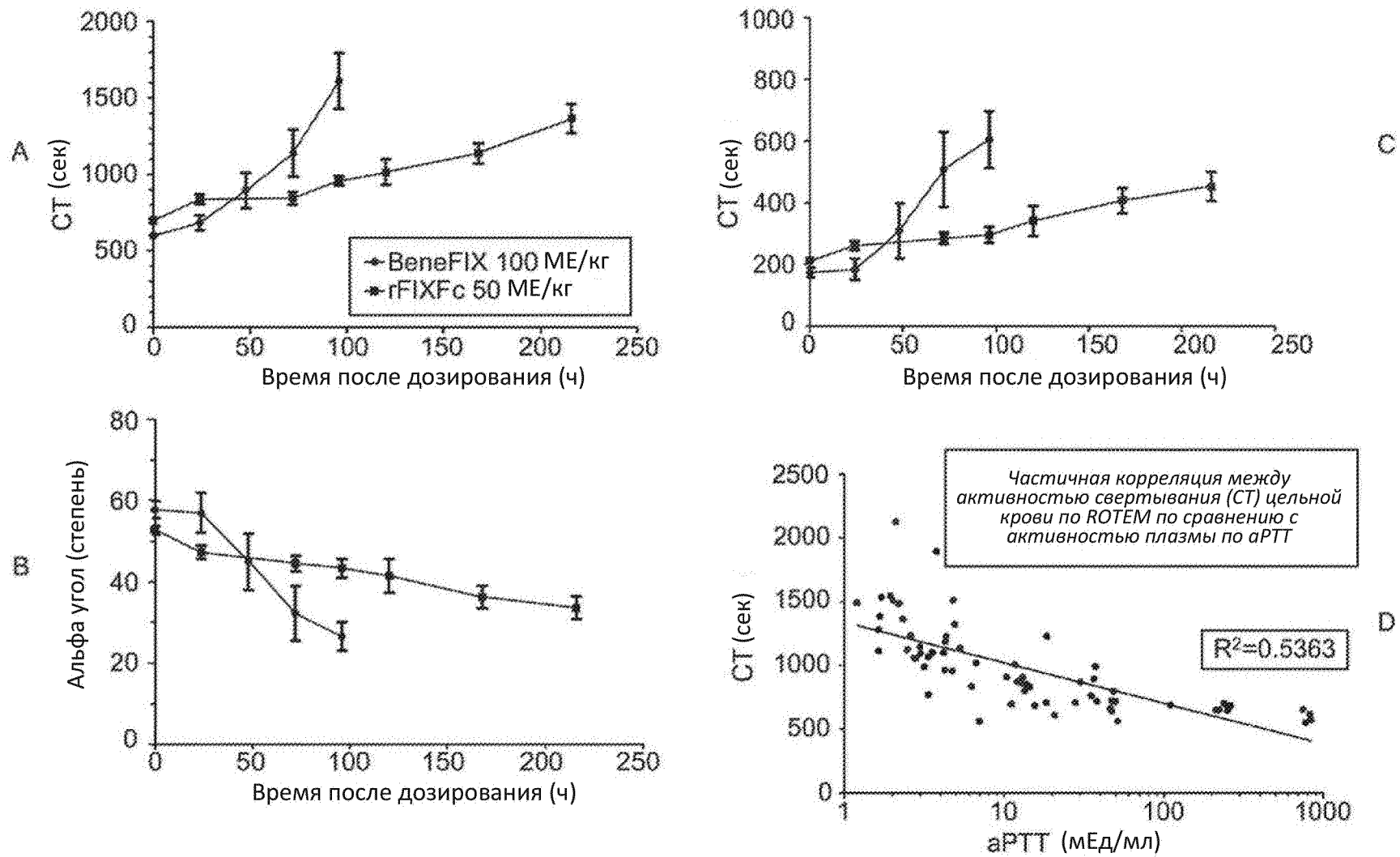
Фиг. 18



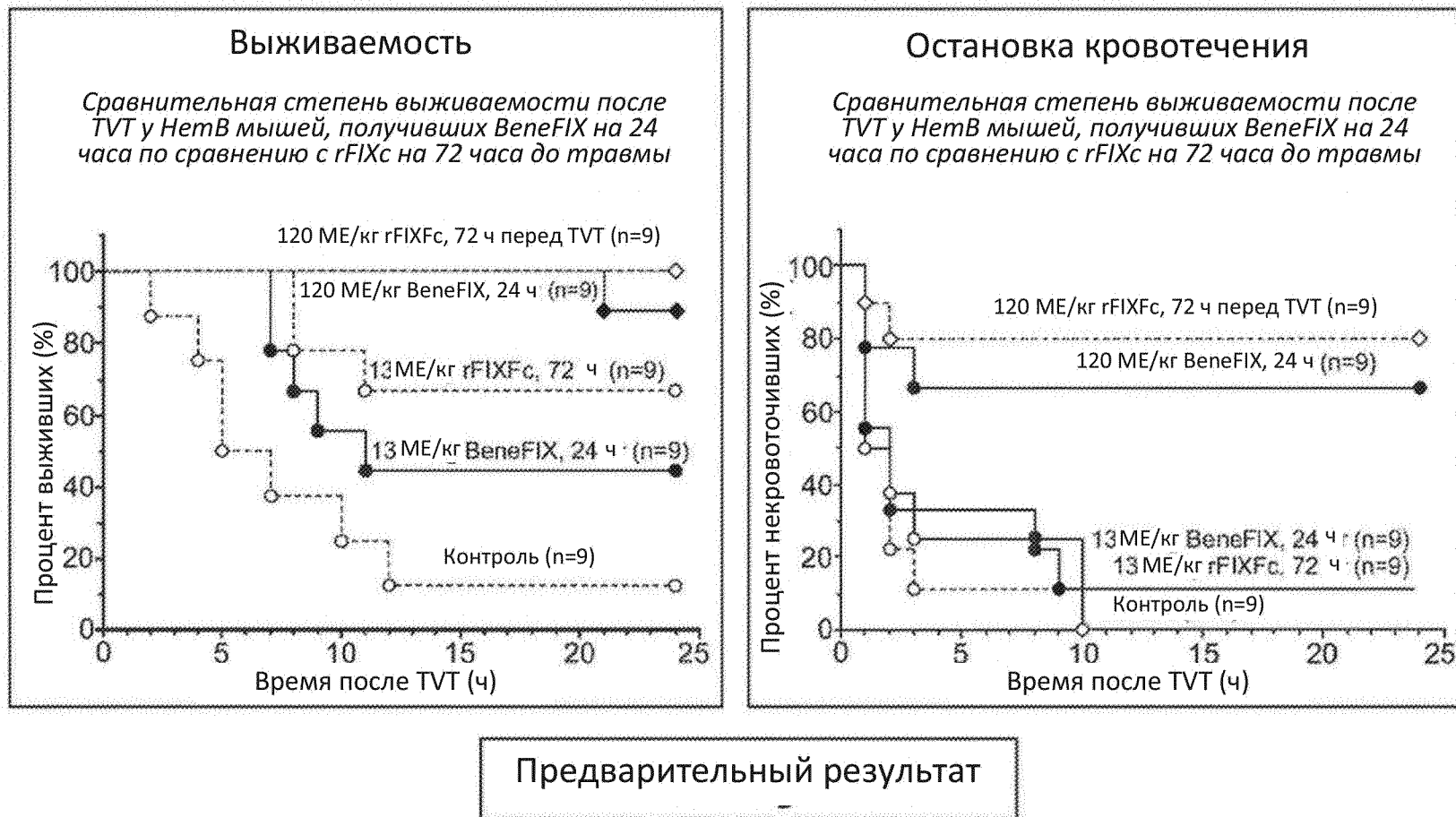
Фиг. 19



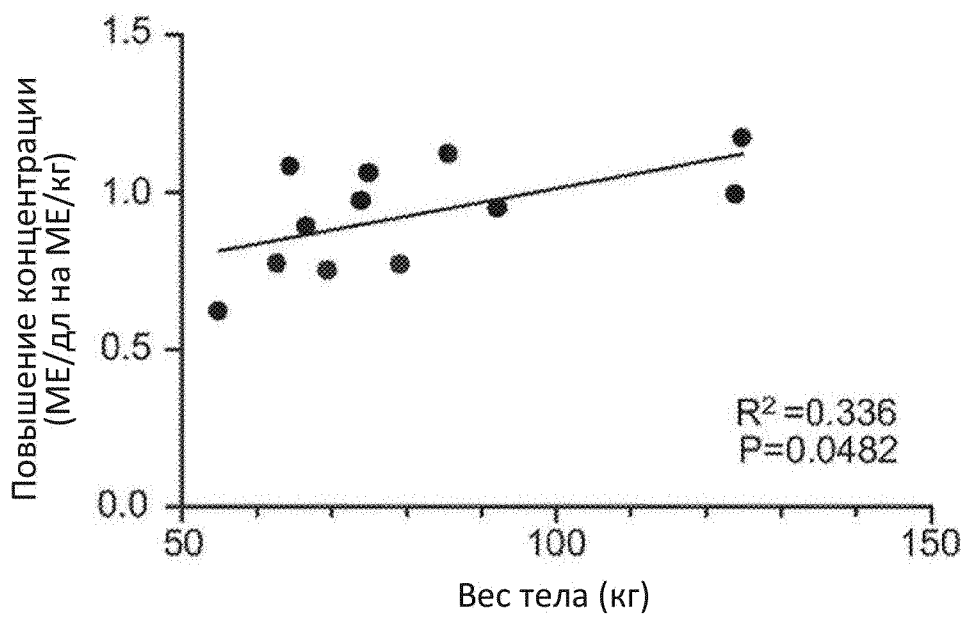
Фиг. 20



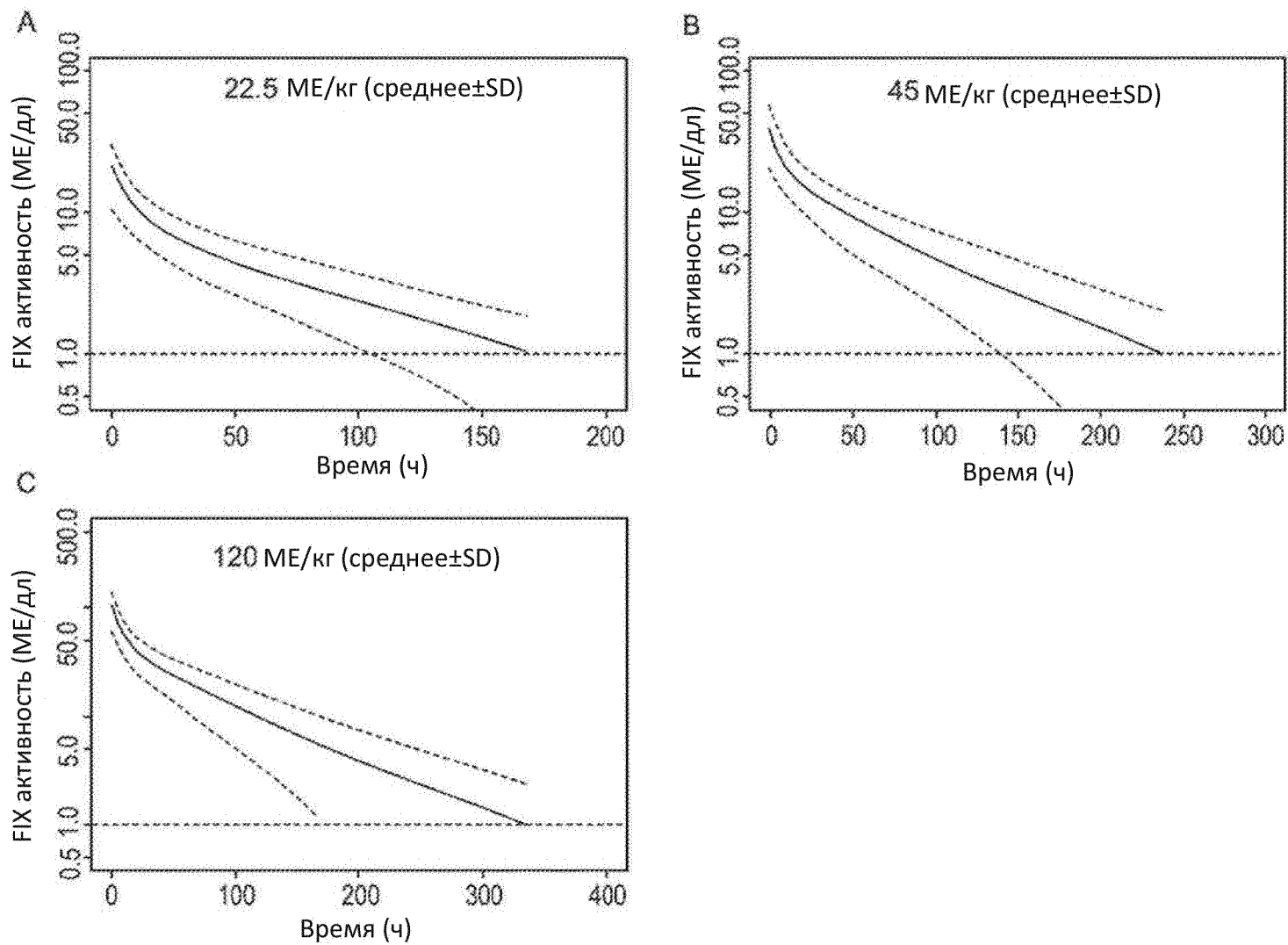
Фиг. 21



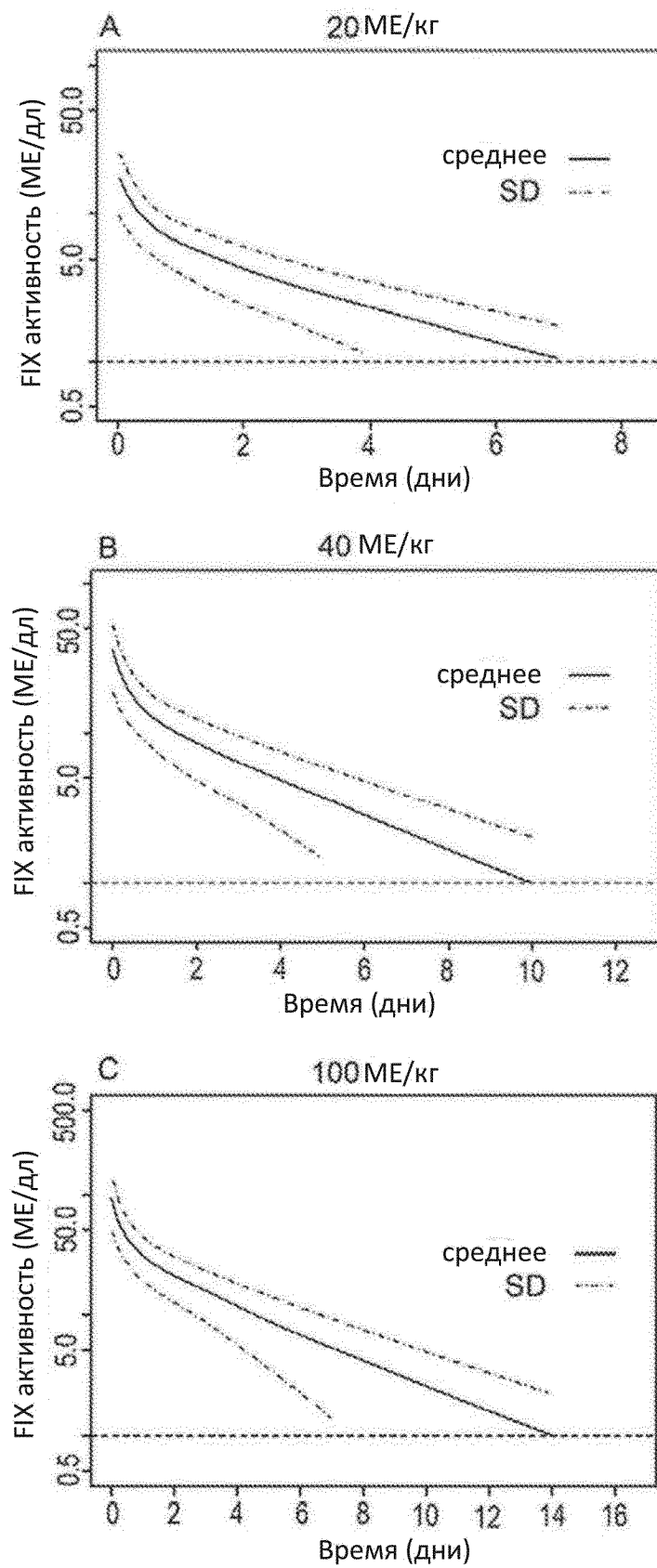
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202092566

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 39/00, 48/00, 38/00, 38/16, 38/36, A61P 7/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2010/012451 A1 (DRK-BLUTSPENDEDIENST BADEN - WUERTTEMBERGHESSEN GMBH et al.) 04.02.2010, реферат, страница 24, параграфы 2, 3, страница 25, параграф 6- страница 29, параграф 2, примеры	1-20
A	WO 2007/149406 A2 (NAUTILUS TECHNOLOGY LLC et al.) 27.12.2007, реферат, страница 2, строки 21-26, страница 32, строка 26- страница 34, строка 26, страница 83, строка 3- страница 91, строка 3, страница 186, строка 8-страница 192, строка 31, примеры, формула	1-20
A	WO 2009/020867 A2 (SYNTONIX PHARMACEUTICALS, INC и др.) 12.02.2009, реферат, параграфы [0007]-[0011], [0211]-[0232], формула	1-20
A	WO 2007/149852 A2 (ASKLEPIOS BIOPHARMACEUTICAL, INC и др.) 27.12.2007, параграфы [0011]-[0017], [0108]-[0121], формула	1-20

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

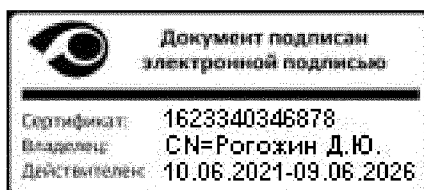
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **12/10/2021**

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин