

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092926** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.07.30

(51) Int. Cl. *F26B 5/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2015.03.24

---

(54) **ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФАКТОР IX**

---

(31) 61/969,801

(32) 2014.03.24

(33) US

(62) 201691807; 2015.03.24

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

(72) Изобретатель:

**Тоум Брайан М., Паркхурст-Ланг  
Чери, Левейлл Брэндон В. (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,  
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,  
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,  
Костюшенкова М.Ю., Лыу Т.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении предложены, среди прочего, прелиофилизационные составы, восстановленные составы и композиции лиофилизированного порошка, содержащие полипептид фактор IX (FIX). В настоящем изобретении также предложены способы лиофилизации для получения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX. Настоящее изобретение относится к прелиофилизационному составу, содержащему (a) полипептид фактор IX (FIX), имеющий коагулирующую активность FIX; (b) буферный агент; (c) стабилизирующий агент; (d) объемообразующий агент и (e) поверхностно-активное вещество, причем номинальный объем для состава составляет менее около 5 мл, а каждый из (a)-(e) присутствует в количестве на флакон (мг/флакон), достаточном для того, чтобы (1) увеличить стабильность полипептида FIX после лиофилизации.

**A2**

**202092926**

**202092926**

**A2**

# ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФАКТОР IX

## Описание

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** Настоящее изобретение в целом относится к области терапевтических средств для лечения расстройств гемостаза.

**[0002]** Гемофилия В (также известная как болезнь Кристмаса) является одним из наиболее распространенных наследственных нарушений свертывания крови в мире. Оно влечет за собой уменьшение коагулирующей активности *in vivo* и *in vitro* и требует постоянного медицинского наблюдения в течение всей жизни больного. В отсутствие вмешательства больной будет страдать от самопроизвольных кровотечений в суставах, которые вызывают сильную боль и ограничение подвижности; кровотечений в мышцы, которые приводят к накоплению крови в этих тканях; самопроизвольных кровотечений в области горла и шеи, которые могут вызывать асфиксию в отсутствие немедленного лечения; почечных кровотечений; также распространены тяжелые кровотечения после хирургических вмешательств, незначительных случайных повреждений или удаления зубов.

**[0003]** Для нормальной коагуляции крови *in vivo* как минимум необходимы серин-протеазные факторы II (протромбин), VII, IX, X и XI (растворимые белки плазмы); кофакторы, в том числе трансмембранный белок тканевый фактор и белки плазмы факторы V и VIII; фибриноген, трансклутаминазный фактор XIII, фосфолипид (в том числе активированные тромбоциты) и кальций. Дополнительные белки, в том числе калликреин, высокомолекулярный кининоген и фактор XII, иногда необходимы для определения свертывания *in vitro*, а в патологических условиях могут играть некоторую роль и *in vivo*.

**[0004]** При гемофилии свертывание крови нарушено недостатком некоторых факторов свертывания крови в плазме. Гемофилия В вызвана дефицитом фактора IX, который возникает или из-за уменьшения синтеза белка фактора IX, или из-за дефектной молекулы со сниженной активностью. Лечение гемофилии проводят замещением недостающего фактора свертывания экзогенным концентратом факторов, значительно обогащенным фактором IX. Однако получение таких концентратов из крови сопряжено с техническими трудностями, как описано ниже.

**[0005]** Выделение фактора IX из плазмы (полученный из плазмы фактор IX; pdFIX) практически всегда дает активный фактор IX. Однако такое выделение фактора IX из

плазмы является очень сложным, поскольку фактор IX присутствует в плазме в низкой концентрации (5 мкг/мл). Andersson, *Thrombosis Research* 7: 451-459 (1975). Дополнительно, выделение из крови требует устранения или дезактивацию возбудителей инфекции, таких как ВИЧ или ВГЦ. Кроме того, pdFIX характеризуется коротким периодом полувыведения, а следовательно, необходимы частые введения. Рекомбинантный фактор IX (rFIX) также доступен, но обладает теми же недостатками - коротким периодом полувыведения и необходимостью частого введения (например, 2-3 раза в неделю для профилактики), что и pdFIX. rFIX также характеризуется более низким уровнем постепенного восстановления активности (величина K) по сравнению с pdFIX, что влечет за собой использование более высоких доз rFIX, чем pdFIX.

**[0006]** Уменьшение смертности, профилактика повреждений суставов и улучшение качества жизни являются важными достижениями, обусловленными разработкой получаемого из плазмы и рекомбинантного фактора IX. Длительная защита от кровотечений представляла бы другое важное продвижение в лечении субъектов с гемофилией В. Однако до настоящего времени не разработаны лекарственные препараты, обеспечивающие длительную защиту. Следовательно, остается необходимость в усовершенствованных способах лечения гемофилии, связанной с дефицитом фактора IX, которые являются лучше переносимыми и более эффективными, чем существующие способы лечения.

**[0007]** В частности, остается необходимость в усовершенствованных лиофилизированных составах, содержащих FIX, с более высокой эффективностью лекарственного препарата, увеличенным сроком хранения, уменьшенной продолжительностью процесса лиофилизации и уменьшенным временем восстановления.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0008]** Настоящее изобретение относится к прелиофилизационному составу, содержащему: (a) полипептид фактор IX (FIX), имеющий коагулирующую активность FIX; (b) буферный агент; (c) стабилизирующий агент; (d) объемообразующий агент; и (e) поверхностно-активное вещество, причем номинальный объем для состава составляет менее около 5 мл, менее около 4 мл или менее около 3 мл, а каждый из (a) – (e) присутствует в количестве на флакон (мг/флакон), достаточном для того, чтобы (1) увеличить стабильность полипептида FIX после лиофилизации; (2) уменьшить время восстановления после лиофилизации; (3) уменьшить разбрызгивание на пробку флакона, содержащего состав; (4) уменьшить время цикла лиофилизации; (5) увеличить срок хранения лиофилизата, полученного из прелиофилизационного состава, при комнатной температуре;

или (б) осуществить любую их комбинацию, по сравнению с контрольным прелиофилизационным составом, причем контрольный состав содержит (а) – (е) в тех же количествах на флакон, что и данный прелиофилизационный состав, но номинальный объем составляет по меньшей мере 5 мл. В конкретном варианте реализации изобретения номинальный объем для состава составляет около 2,65 мл.

**[0009]** В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит по меньшей мере 100 МЕ/флакон полипептида FIX. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит от около 200 МЕ/флакон до около 10000 МЕ/флакон полипептида FIX.

**[0010]** В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FIX содержит FIX дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FIX дополнительно содержит гетерологичный фрагмент, присоединенный к FIX дикого типа. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, увеличивающий период полувыведения FIX. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент включает полипептид или непептидный фрагмент. В одном варианте реализации изобретения фрагмент, увеличивающий период полувыведения FIX, включает партнера по связыванию FcRn или фрагмент Fc. В одном варианте реализации изобретения полипептид FIX по меньшей мере на около 80 %, по меньшей мере на около 85 %, по меньшей мере на около 90 %, по меньшей мере на около 95 % или 100 % идентичен SEQ ID №: 2.

**[0011]** В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем составляет около 4 мл, около 3,5 мл, около 3,0 мл, около 2,9 мл, около 2,8 мл, около 2,7 мл, около 2,65 мл, около 2,6 мл, около 2,5 мл, около 2,4 мл, около 2,3 мл, около 2,2 мл, около 2,1 мл или около 2,0 мл.

**[0012]** В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенное время восстановления составляет менее 1,5 минут, менее 1 минуты, менее 50 секунд, менее 40 секунд, менее 30 секунд, менее 20 секунд или менее 10 секунд.

**[0013]** В некоторых вариантах реализации изобретения буферный агент представляет собой L-гистидин. В одном варианте реализации изобретения буферный агент присутствует в концентрации (мг/мл) от около 3 мг/мл до около 15 мг/мл. В другом варианте реализации изобретения буферный агент присутствует в концентрации от около 8 мг до около 39 мг на флакон.

**[0014]** В некоторых вариантах реализации изобретения стабилизирующий агент представляет собой сахарозу. В одном варианте реализации изобретения стабилизирующий агент присутствует в концентрации (мг/мл) от 10 мг/мл до около 50 мг/мл. В другом

варианте реализации изобретения стабилизирующий агент присутствует в концентрации от около 27 мг до около 132 мг на флакон.

**[0015]** В некоторых вариантах реализации изобретения объемообразующий агент представляет собой маннит. В одном варианте реализации изобретения объемообразующий агент присутствует в концентрации (мг/мл) от 20 мг/мл до около 100 мг/мл. В другом варианте реализации изобретения объемообразующий агент присутствует в концентрации от около 53 мг на флакон до около 265 мг на флакон.

**[0016]** В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В одном варианте реализации изобретения поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации (мг/мл) от 0,01 мг/мл до около 5 мг/мл. В другом варианте реализации изобретения поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,03 мг до около 13 мг на флакон.

**[0017]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к прелиофилизационному составу, содержащему: (a) от около 80 до около 2750 МЕ/мл rFIXFc; (b) около 7,76 мг/мл L-гистидина; (c) около 47,6 мг/мл маннита; (d) около 23,8 мг/мл сахарозы; и (e) около 0,2 мг/мл полисорбата 20.

**[0018]** Настоящее изобретение дополнительно относится к лиофилизированному порошку, содержащему полипептид FIX, буферный агент, стабилизирующий агент, объемообразующий агент, поверхностно-активное вещество или любую их комбинацию.

**[0019]** В некоторых вариантах реализации изобретения остаточное содержание влаги в лиофилизированном порошке составляет менее 1 %.

**[0020]** В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит: (a) полипептид FIX в количестве от около 2 мг на флакон до около 150 мг на флакон; (b) буферный агент в количестве от 10 мг на флакон до около 30 мг на флакон; (c) объемообразующий агент в количестве от около 70 мг на флакон до около 200 мг на флакон; (d) стабилизирующий агент в количестве от 30 мг на флакон до 100 мг на флакон; и (e) поверхностно-активное вещество в количестве от 0,05 мг на флакон до около 5 мг на флакон.

**[0021]** В другом варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит: (a) лиофилизированный полипептид FIX в количестве от около 2,2 мг на флакон до около 125 мг на флакон; (b) буферный агент в количестве от 12,5 мг на флакон до около 25 мг на флакон; (c) стабилизирующий агент в количестве от около 32,5 мг на флакон до около 80 мг на флакон; (d) объемообразующий агент в количестве от около 75 мг на флакон до 150 мг на флакон; и (e) поверхностно-активное вещество в количестве от около 0,1 мг/мл до около 2 мг/мл.

**[0022]** В другом варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит: (a) от около 2,2 до около 125 мг/флакон полипептида FIX; (b) около 20,6 мг/флакон L-гистидина; (c) около 126,1 мг/флакон маннита; (d) около 63,1 мг/флакон сахарозы; и (e) около 0,53 мг/флакон полисорбата 20.

**[0023]** Настоящее изобретение также относится к восстановленному составу, содержащему лиофилизированный порошок, описанный в данном документе, восстановленный восстанавливающим буферным раствором.

**[0024]** В одном варианте реализации изобретения восстановленный состав содержит: (a) полипептид FIX в концентрации от около 0,9 мг/мл до около 50 мг/мл; (b) буферный агент в концентрации от 1,5 мг/мл до около 7,5 мг/мл; (c) объемобразующий агент в концентрации от 10 мг/мл до около 50 мг/мл; (d) стабилизирующий агент в концентрации от около 5 мг/мл до 25 мг/мл на флакон; и (e) поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,005 мг/мл до около 2,5 мг/мл.

**[0025]** В другом варианте реализации изобретения восстановленный состав содержит: (a) полипептид FIX в концентрации от около 0,9 мг/мл до около 50 мг/мл; (b) буферный агент в концентрации около 3,88 мг/мл; (c) объемобразующий агент в концентрации около 23,8 мг/мл; (d) стабилизирующий агент в концентрации около 11,9 мг/мл; (e) поверхностно-активное вещество в концентрации около 0,1 мг/мл; и (f) восстанавливающий буферный раствор.

**[0026]** В другом варианте реализации изобретения восстановленный состав содержит: (a) полипептид FIX в концентрации от около 80 МЕ/мл до около 2750 МЕ/мл; (b) буферный агент в концентрации около 25 мМ; (c) объемобразующий агент в концентрации около 131 мМ; (d) стабилизирующий агент в концентрации около 35 мМ; (e) поверхностно-активное вещество в концентрации 0,01 % (масса/объем); и (f) восстанавливающий буферный раствор.

**[0027]** Настоящее изобретение дополнительно относится к способу введения полипептида FIX пациенту с гемофилией В, нуждающемуся в этом, или способу профилактики, лечения, облегчения или регулирования гемофилии В у пациента, нуждающегося в этом, который включает введение пациенту восстановленных составов, описанных в данном документе.

**[0028]** Настоящее изобретение также относится к способу получения лиофилизованного порошка, содержащего полипептид FIX, который включает лиофилизацию прелиофилизационных составов, описанных в данном документе.

**[0029]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лиофилизации полипептида FIX, включающему: (a) «стадию замораживания», включающую

замораживание прелиофилизационного состава, содержащего полипептид FIX и водный растворитель; (b) «стадию вакуумирования», включающую уменьшение давления в камере с замороженным прелиофилизационным составом на величину, достаточную для удаления водного растворителя из замороженного прелиофилизационного состава; и (c) одну «стадию сушки», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава выше температуры коллапса, что приводит к образованию лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав фильтруют в стерильных условиях и заливают во флакон в стерильных условиях до стадии (a).

**[0030]** В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающим: (a) «стадию замораживания», включающую замораживание прелиофилизационного состава, содержащего полипептид FIX, путем снижения температуры в течение около 2 часов до температуры замораживания, которая составляет около  $-55^{\circ}\text{C}$ , и выдерживание при температуре замораживания в течение около 2 часов; (a') «стадию отжига», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (a), до температуры отжига, составляющей около  $-6^{\circ}\text{C}$ , в течение около 1,5 часов, выдерживание при температуре отжига в течение около 3 часов и понижение температуры в течение около 1,5 часов до около  $-55^{\circ}\text{C}$ ; (b) «стадию вакуумирования», включающую выдерживание замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (a'), при около  $-55^{\circ}\text{C}$  в течение двух часов при атмосферном давлении и понижение давление в течение около 2 часов до около 0,33 мбар; и (c) одну «стадию сушки», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (b), в течение 3 часов до около  $40^{\circ}\text{C}$ , при этом поддерживая давление на уровне около 0,33 мбар, и выдерживание замороженного прелиофилизационного состава при температуре около  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 25 часов, при этом поддерживая давление на уровне около 0,33 мбар, что приводит к получению лиофилизированного порошка.

**[0031]** В дополнительном аспекте изобретения лиофилизированный порошок имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (1) повышенной стабильности полипептида FIX после лиофилизации; (2) уменьшенного времени восстановления после лиофилизации; (3) уменьшенного разбрызгивания на пробку флакона, содержащего состав; (4) уменьшенного времени цикла лиофилизации; (5) увеличенного срока хранения лиофилизата, полученного из прелиофилизационного состава, при комнатной температуре; или (6) любой их комбинации.

**[0032]** В одном аспекте в изобретении предложен способ стабилизации лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем увеличение стабильности лиофилизированного порошка определено с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ) относительно лиофилизированного порошка, приготовленного с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0033]** В другом аспекте в изобретении предложен способ увеличения срока хранения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем увеличение срока хранения лиофилизированного порошка определено с помощью ЭХ и/или анализа коагулирующей активности FIX относительно срока хранения лиофилизированного порошка, приготовленного с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0034]** В изобретении также предложен способ уменьшения времени восстановления лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем время восстановления лиофилизированного порошка уменьшено относительно времени восстановления лиофилизированного порошка, приготовленного с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0035]** В изобретении дополнительно предложен способ уменьшения продолжительности процесса лиофилизации при получении лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем продолжительность процесса лиофилизации прелиофилизационного состава уменьшена относительно продолжительности процесса лиофилизации при получении лиофилизированного порошка с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**[0036]** Фиг. 1 иллюстрирует схему загрузки флаконов для каждого цикла лиофилизации. Цифры 1, 2 и 3 указывают на расположение термопар.

**[0037]** Фиг. 2 иллюстрирует предсказанную при МЭ кривую зависимости остаточного содержания влаги от параметров лиофилизации - температуры, вакуума и времени.



**[0038]** Фиг. 3 иллюстрирует предсказанную при МЭ кривую зависимости температуры продукта в течение сублимации от параметров лиофилизации - температуры и вакуума.

**[0039]** Фиг. 4 иллюстрирует предсказанную при МЭ кривую зависимости массового потока во флаконе в течение сублимации от параметров лиофилизации - температуры и вакуума.

**[0040]** Фиг. 5 иллюстрирует данные о лиофилизации, полученные из испытания 8 МЭ в примере 2, условия которого аналогичны предлагаемым для цикла лиофилизации rFIXFc-2G (температура полки 40 °С, вакуум в камере, соответствующий давлению 250 мторр (0,33 мбар), и время сушки 25 часов).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0041]** В изобретение предложены, среди прочего, прелиофилизационные составы, восстановленные составы и композиции лиофилизованного порошка, содержащие полипептид фактор IX (FIX). В изобретении также предложены способы лиофилизации для получения лиофилизованного порошка, содержащего полипептид FIX. Также предложены способы стабилизации лиофилизованного порошка, содержащего полипептид FIX, способ увеличения срока хранения лиофилизованного порошка, содержащего полипептид FIX, способ уменьшения времени восстановления лиофилизованного порошка, содержащего полипептид FIX, и способ уменьшения продолжительности процесса лиофилизации прелиофилизационного состава, содержащего полипептид FIX. Дополнительно, в изобретении предложены способы профилактики, лечения, облегчения или регулирования гемофилии В у пациента, нуждающегося в этом, путем введения восстановленного состава, содержащего полипептид FIX.

### *Определения*

**[0042]** Повсюду в данном описании объект в единственном числе относится к одному или более объектам; например, понятно, что «полинуклеотид» представляет один или более полинуклеотидов. Таким образом, термины в единственном числе, термины «один или более» и «по меньшей мере один» могут применяться в настоящем документе взаимозаменяемо.

**[0043]** Более того, использование «и/или» в настоящем документе следует принимать в качестве частного описания любого из двух указанных свойств или компонентов отдельно от второго свойства или компонента или вместе с ним. Следовательно, подразумевается, что термин «и/или», используемый в данном документе в

таким выражении, как «А и/или В», включает «А и В», «А или В», только «А» и только «В». Аналогично, подразумевается, что термин «и/или», используемый в таком выражении, как «А, В и/или С», охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; только А; только В; и только С.

**[0044]** Необходимо понимать, что повсюду в настоящем документе, где для описания аспектов применяется формулировка «содержит», также подразумеваются другие аналогичные аспекты, описываемые понятиями «состоит из» и/или «в основном состоит из».

**[0045]** Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предлагают специалисту в данной области техники общий словарь многих терминов, использованных в настоящем описании.

**[0046]** Единицы, приставки и символы указаны в форме, принятой в Международной системе единиц (Système International de Unités - СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- до карбоксильного конца. Приведенные в настоящем документе заголовки не ограничивают различные аспекты изобретения, которые могут быть доступны при обращении к описанию в целом. Следовательно, термины, определения которых приведены непосредственно далее по тексту, более полно определяются на основании описания в полном объеме.

**[0047]** Термин «около» в настоящем документе означает приблизительно, ориентировочно, примерно или порядка, а значение будет зависеть от ограничений измерительной системы. Когда термин «около» используют в сочетании с диапазоном числовых значений, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и нижеуказанных числовых значений. В целом термин «около» может отклонить числовое значение выше и нижеуказанного значения на некоторую величину, например 10 процентов или 20 процентов, в сторону увеличения или уменьшения (выше или ниже). Если не указано иное, предполагается, что значение «около» находится в пределах приемлемой погрешности для конкретной величины для состава или композиции.

**[0048]** Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных аминокислотных остатков.

**[0049]** Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды могут представлять собой ДНК, кДНК, РНК, одноцепочечные или двухцепочечные, векторы, плазмиды, фаги или вирусы.

**[0050]** При использовании в данном документе, термин «введение» означает, например, прописывать или давать фармацевтическую композицию, содержащую полипептид FIX, субъекту. Примеры путей введения включают, но не ограничиваясь им, внутривенный, например внутривенную инъекцию и внутривенную инфузию, например, посредством центрального венозного доступа. Дополнительные пути введения включают подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и ингаляционное введение. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид FIX, может содержать одно или более вспомогательных веществ, как описано в данном документе. Преимущества способов, композиций и фармацевтических наборов, предложенных в данном документе, включают: улучшение соблюдения режима лечения; уменьшение прорывных кровотечений; повышение защиты суставов от кровотечений; профилактику повреждения суставов; сокращение заболеваемости; сокращение смертности; продолжительную защиту от кровотечений; уменьшение тромбообразования; и улучшение качества жизни. Введение включает парентеральное введение. В некоторых вариантах реализации изобретения парентеральное введение представляет собой внутривенное или подкожное введение.

**[0051]** Термин «лечение», при использовании в данном документе, означает уменьшение интенсивности или ослабление одного или более симптомов нарушений или расстройств свертывания крови, включая, но не ограничиваясь им, гемофилию В. В одном варианте реализации изобретения «лечение» нарушения или расстройства свертывания крови включает профилактику одного или более симптомов нарушения или расстройства свертывания крови. При нарушении или расстройстве свертывания крови, вызванном дефицитом FIX (например, низкая исходная активность FIX), термин «лечение» может означать заместительную терапию препаратом FIX. После введения полипептида FIXFc субъекту, у него может достигаться и/или поддерживаться минимальный уровень активности FIX в плазме на уровне около 1 МЕ/дл или выше 1 МЕ/дл. В других вариантах реализации изобретения «лечение» означает уменьшение частоты возникновения одного или более симптомов нарушений или расстройств свертывания крови, например

самопроизвольных или неконтролируемых приступов кровотечения. Однако «лечение» не обязательно должно приводить к выздоровлению.

**[0052]** «Пациент», при использовании в данном документе, включает индивида, у которого был по меньшей мере один случай неконтролируемого кровотечения, у которого было диагностировано заболевание или расстройство, связанное с неконтролируемыми приступами кровотечений, например нарушение или расстройство свертывания крови, например гемофилия В, который подвержен неконтролируемым приступам кровотечений, например гемофилии, или который имеет любую комбинацию этих признаков. Пациенты также могут включать индивида, который имеет риск возникновения одного или более неконтролируемых приступов кровотечения до определенного действия, например хирургического вмешательства, занятий спортом или любой другой напряженной деятельности. Пациент может иметь исходную активность F1X, которая составляет менее 1 %, менее 0,5 %, менее 2 %, менее 2,5 %, менее 3 % или менее 4 %. Пациенты также включают детей. Пациенты детского возраста представляют собой пациентов в возрасте от рождения до 20 лет, предпочтительно от рождения до 18 лет, от рождения до 16 лет, от рождения до 15 лет, от рождения до 12 лет, от рождения до 11 лет, от рождения до 6 лет, от рождения до 5 лет, от рождения до 2 лет и от 2 до 11 лет.

**[0053]** «Исходный», при использовании в данном документе, представляет собой наиболее низкий измеренный уровень фактора IX у субъекта до введения дозы. Уровни фактора IX в плазме можно измерить два раза до введения дозы: при обследовании и непосредственно перед введением дозы. В альтернативном варианте, (a) исходный уровень у субъектов, для которых активность F1X до лечения составляет <1 %, у которых не найден антиген F1X, и которые имеют нонсенс-мутации в генотипе, может быть установлен равным 0 %, (b) исходный уровень для субъектов с активностью F1X до лечения <1 %, у которых обнаружен антиген F1X, может быть установлен равным 0,5 %, (c) исходный уровень для субъектов, для которых активность F1X до лечения составляет 1 – 2 %, представляет собой Cmin (наиболее низкая активность в течение ФК исследования) и (d) исходный уровень для субъектов, для которых активность F1X до лечения составляет  $\geq 2$  %, может быть установлен равным 2 %. Активность выше исходной до введения дозы можно рассматривать как присутствие остаточного количества лекарственного средства из предыдущего лечения, ее можно снизить до исходного уровня и вычесть из ФК данных после введения rF1XFBR.

**[0054]** «Минимальный уровень», при использовании в данном документе, представляет собой наиболее низкий уровень активности фактора IX в плазме, который достигается после введения дозы химерного полипептида по данному изобретению или другой молекулы фактора IX и до введения следующей дозы, при наличии таковой.

Минимальный уровень используется в данном документе взаимозаменяемо с «пороговым значением». Для того, чтобы рассчитать минимальный уровень, исходные уровни фактора IX вычитают из измеряемых уровней фактора IX.

**[0055]** При использовании в данном документе термин «период полувыведения» относится к биологическому периоду полувыведения конкретного полипептида *in vivo*. Период полувыведения может быть представлен как время, необходимое для выведения половины введенного субъекту количества из кровотока и/или других тканей животного.

**[0056]** Термины «длительного действия» и «продолженного действия» в данном документе используются взаимозаменяемо. В одном варианте реализации изобретения термины «длительного действия» и «продолженного действия» указывают на то, что активность FIX, возникающая в результате введения полипептида rFIXFBR, сохраняется дольше, чем активность FIX дикого типа (например, BENEFIX<sup>®</sup> или FIX, полученного из плазмы («pdFIX»)). «Большую продолжительность действия» FIX можно измерить любым известным в данной области техники способом, например, с помощью анализа на АЧТВ, хромогенного анализа, ROTEM (ротационной тромбозластометрии), ТГТ и т.д. В одном варианте реализации изобретения «большую продолжительность действия» FIX можно продемонстрировать с помощью  $T_{1/2\beta}$  (активность). В другом варианте реализации изобретения «большую продолжительность действия» FIX можно предположить на основании уровня антигена FIX, присутствующего в плазме, например, с помощью  $T_{1/2\beta}$  (антиген).

**[0057]** Термины «лиофилизат», «лиофилизированный порошок», «лиофилизированный продукт» или «масса, уплотненная в таблетку», при использовании в данном документе, обозначают состав, который получили с использованием способов сублимационной сушки. Растворитель (например, воду) удаляют замораживанием с последующей сублимацией под вакуумом и десорбцией остаточного количества воды при повышенной температуре. В фармацевтической области лиофилизат присутствует в виде порошка или физически стабильной массы, уплотненной в таблетку. Лиофилизат характеризуется быстрым растворением после добавления восстанавливающей среды.

**[0058]** Термины «прелиофилизационный состав» или «исходная прелиофилизационная смесь», при использовании в данном документе, обозначают жидкий состав до удаления растворителя (например, воды) с использованием сублимационной сушки. «Объем наполнения» прелиофилизационного состава представляет собой общий объем жидкого состава до лиофилизации.

**[0059]** « $T_{1/2\beta}$ », или « $T_{1/2\beta}$  бета», или «бета ПП», при использовании в данном документе, представляет собой период полувыведения, связанный с фазой выведения,

$t_{1/2\beta} = (\ln 2) / \text{константу скорости выведения}$ , связанную с конечной фазой.  $T_{1/2 \text{ бета}}$  можно определить по активности FIX или по уровню антигена FIX в плазме.  $T_{1/2 \text{ бета}}$ , основанный на активности, обозначен как  $T_{1/2 \text{ бета}}(\text{активность})$ , а  $T_{1/2 \text{ бета}}$ , основанный на уровне антигена FIX, может быть обозначен как  $T_{1/2 \text{ бета}}(\text{антиген})$ . И  $T_{1/2 \text{ бета}}(\text{активность})$ , и  $T_{1/2 \text{ бета}}(\text{антиген})$  могут быть представлены как интервалы или геометрическое среднее.

**[0060]** Термин «восстановленный состав» или «композиция после восстановления», при использовании в данном документе, обозначает состав, который лиофилизирован и повторно растворен добавлением растворителя. Растворитель может содержать, без ограничения, воду для инъекций (ВДИ), бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), растворы хлорида натрия (например, 0,9 % (масса/объем) раствор NaCl), растворы глюкозы (например, 5 % глюкозы), растворы, содержащие поверхностно-активные вещества (например, 0,01 % полисорбата 20 или полисорбата 80), рН-буферный раствор (например, фосфатные буферные растворы) и их комбинации.

### *Процесс лиофилизации в целом*

**[0061]** Лиофилизация, или сублимационная сушка, представляет собой процесс, широко используемый в фармацевтической промышленности для сохранения биологических и фармацевтических веществ. Процесс лиофилизации, также известный как цикл лиофилизации, традиционно разделяют на три отдельные стадии: замораживание, первичная сушка и вторичная сушка. «Лиофилизация», при использовании в данном документе, относится к полному процессу лиофилизации, включающему как стадии замораживания, так и стадии сушки.

**[0062]** При лиофилизации вода, присутствующая в веществе, превращается в лед на стадии замораживания, а затем удаляется из материала путем прямой сублимации под низким давлением во время стадии первичной сушки. Однако в течение замораживания не вся вода превращается в лед. Некоторая часть воды удерживается в матрице твердых веществ, содержащей, например, компоненты состава и/или активный ингредиент. Избыток связанной воды в матрице можно уменьшить до желаемого уровня остаточной влажности во время стадии вторичной сушки. Все стадии лиофилизации: замораживание, первичная сушка и вторичная сушка - определяют свойства готового продукта. Первичная сушка, как правило, представляет собой наиболее длинную стадию процесса лиофилизации, следовательно, оптимизация этой части процесса имеет значительный экономический эффект.

**[0063]** В некоторых аспектах изобретения процесс лиофилизации включает только стадию первичной сушки.

**[0064]** В некоторых аспектах изобретения процесс лиофилизации также включает отдельную «стадию вакуумирования» между стадией замораживания и стадией первичной сушки.

**[0065]** В других аспектах изобретения процесс лиофилизации дополнительно включает «стадию отжига» между стадией замораживания и стадией первичной сушки.

**[0066]** Термин «стадия отжига», при использовании в данном документе, относится к стадии в процессе лиофилизации полипептидного препарата, который подвергают лиофилизации, до стадии сушки препарата, в которой температуру препарата повышают от более низкой температуры до более высокой температуры, а после некоторого периода времени снова понижают.

**[0067]** Традиционно оптимизацию цикла и состава выполняют так, чтобы температура продукта в течение первичной сушки никогда не превышала температуру коллапса. Термин «температура коллапса», при использовании в данном документе, относится к температуре продукта в течение сублимационной сушки, выше которой масса, уплотненная в таблетку, начинает терять свою исходную структуру. Выше температуры коллапса в продукте могут наблюдаться медленное нерегулярное пузырение, набухание, вспенивание, кавитация, образование многочисленных отверстий, макроскопическое разрушение, стягивание и гранулирование, которые могут влиять на внешний вид продукта. Вследствие этого разрушение может приводить к плохой стабильности продукта, длительному времени сушки, неравномерной сушке и потере структуры. См., например, US 2010/0041870.

**[0068]** Лиофилизированный продукт согласно настоящему изобретению можно оценить на основании анализа качества продукта, времени восстановления, качества восстановления, высокой молекулярной массы, содержания влаги, температуры стеклования ( $T_g$ ) и биологической или биохимической активности. Как правило, анализ качества продукта включает определение скорости деградации продукта, с использованием методов, включающих, но не ограничиваясь ими, эксклюзионную хроматографию (ЭХ), катионообменную ВЭЖХ (СЕХ-НPLC), рентгеноструктурный анализ (РСА), модулированную дифференциальную сканирующую калориметрию (МДСК), обращенно-фазовую ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ), метод многоуглового светорассеяния (МУС), флуоресценцию, ультрафиолетовую абсорбцию, нефелометрию, капиллярный электрофорез (КЭ), ДСН-ПААГ-электрофорез и их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения оценка лиофилизированного продукта в соответствии с настоящим изобретением включают стадию оценки внешнего вида массы, уплотненной в таблетку.

Дополнительно, лиофилизированный продукт можно оценить на основании биологической или биохимической активности продукта, как правило, после восстановления.

### *Ллиофилизированные составы, содержащие фактор IX*

**[0069]** В данном изобретение предложены прелиофилизационные составы, лиофилизированные и восстановленные составы или фармацевтические композиции, содержащие полипептид FIX.

**[0070]** В некоторых аспектах изобретения составы, описанные в данном документе, содержат полипептид FIX, буферный агент, стабилизирующий агент, объемобразующий агент и поверхностно-активное вещество или любую их комбинацию. Состав также может содержать любые другие агенты, которые пригодны для фармацевтического состава.

### *Полипептид фактор IX (FIX)*

**[0071]** Полипептид FIX или белок FIX, применяемый в составе, представляет собой функциональный белок фактор FIX в его обычной роли в процессе коагуляции, если не указано иное. Таким образом, полипептид FIX включает вариантные полипептиды, которые являются функциональными, и полинуклеотиды, которые кодируют такие функциональные вариантные полипептиды. В одном варианте реализации изобретения полипептиды FIX представляют собой человеческие, бычьи, свиные, собачьи, кошачьи и мышьи полипептиды FIX. Полипептид полной длины и полинуклеотидные последовательности FIX являются известными, как и многие другие функциональные варианты, например, фрагменты, мутанты и модификации. Полипептиды FIX включают FIX полной длины, FIX полной длины без метионина на N-конце, FIX полной длины без сигнальной последовательности, зрелый FIX (без сигнальной последовательности и пропептида), зрелый FIX с дополнительным метионином на N-конце. FIX можно получить рекомбинантным способом («рекомбинантный фактор IX» или «rFIX»), т.е. он не встречается в природе или не получен из плазмы.

**[0072]** Известно большое количество функциональных вариантов FIX. В международной публикации № WO 02/040544 A3, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, на странице 4, строки 9-30 и странице 15, строки 6-31 описаны мутанты, которые демонстрируют повышенную устойчивость к ингибированию гепарином. В международной публикации № WO 03/020764 A2, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, в Таблицах 2 и 3 (на страницах 14-24) и на странице 12, строки 1-27 описаны мутанты FIX с пониженной Т-клеточной иммуногенностью. В международной публикации № WO 2007/149406 A2, которая



включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, со страницы 4, строка 1 до страницы 19, строка 11 описан функциональный мутант FIX, который демонстрируют повышенную стабильность белка, повышенное время полужизни *in vivo* и *in vitro* и повышенную устойчивость к протеазам. В WO 2007/149406 A2 со страницы 19, линия 12 до страницы 20, линия 9 также описаны химерные молекулы FIX и другие варианты. В международной публикации № WO 08/118507 A2, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, со страницы 5, строка 14 до страницы 6, строка 5 описаны мутанты FIX, которые демонстрируют повышенную коагулирующую активность. В международной публикации № WO 09/051717 A2, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, со страницы 9, строка 11 до страницы 20, строка 2 описаны мутанты FIX с повышенным количеством сайтов N- и/или O-гликозилирования, что приводит к увеличению периода полувыведения и/или уровня восстановления активности. В международной публикации № WO 09/137254 A2, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, со страницы 2, абзац [006] до страницы 5, абзац [011] и со страницы 16, абзац [044] до страницы 24, абзац [057] также описаны мутанты фактора IX с повышенным количеством сайтов гликозилирования. В международной публикации № WO 09/130198 A2, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, со страницы 4, строка 26 до страницы 12, строка 6 описан функциональный мутант FIX с повышенным количеством сайтов гликозилирования, что приводит к увеличению периода полувыведения. В международной публикации № WO 09/140015 A2, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, со страницы 11, абзац [0043] до страницы 13, абзац [0053] описаны функциональные мутанты FIX с повышенным количеством остатков цистеина, что можно использовать для связывания с полимером (например, ПЭГ). Также полипептиды FIX описаны в международной заявке № PCT/US2011/043569, поданной 11 июля 2011 г. и опубликованной под номером WO 2012/006624 12 января 2012 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0073]** В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FIX содержит FIX дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FIX дополнительно содержит гетерологичный фрагмент, присоединенный к FIX дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, увеличивающий период полувыведения FIX. В некоторых вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент включает полипептид или непептидный фрагмент.

**[0074]** В других вариантах реализации изобретения полипептид FIX представляет собой полипептид FIX длительного действия. Полипептид FIX длительного действия может содержать участок FIX и другой участок, например гетерологичный фрагмент, который способен увеличивать *in vivo* или *in vitro* время полужизни полипептида FIX. Примеры фрагментов, которые не являются FIX, включают, например, Fc, альбумин, последовательность PAS, трансферрин, СТР (28-аминокислотный С-концевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) с 4 О-гликанами), полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтиловый крахмал (ГЭК), полипептид, связывающий альбумин, малые молекулы, связывающие альбумин, или любую их комбинацию. Примеры полипептидов FIX длительного действия по данному изобретению включают, например, полипептиды фактор IX - Fc, полипептиды фактор IX - альбумин, полипептиды фактор IX - PAS, полипептиды фактор IX - трансферрин, полипептиды фактор IX - СТР, полипептиды фактор IX - ПЭГ, полипептиды фактор IX - ГЭК, полипептиды фактор IX - полипептид, связывающий альбумин, или полипептиды фактор IX - малая молекула, связывающая альбумин.

**[0075]** В одном варианте реализации изобретения полипептид FIX представляет собой rFIXFc, рекомбинантный гибридный белок, состоящий из фактора свертывания крови человека IX (FIX) и домена Fc антитела человека (изотип IgG1). См., например, заявку РСТ № РСТ/US2011/043569, поданную 11 июля 2011 г. и опубликованную под номером WO 2012/006624, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Полипептид rFIXFc представляет собой гетеродимерный белок с одной цепью FIXFc (FIXFc-sc) и одной цепью Fc (Fc-sc), которые связаны вместе посредством двух дисульфидных связей в шарнирной области Fc. rFIXFc необходимы две субъединицы белка, FIXFc-sc (642 аминокислоты, SEQ ID №:2) и Fc-sc (227 аминокислот, SEQ ID №:4), чтобы накапливаться в трансфицированной клеточной линии с образованием целевого продуцируемого белка rFIXFc. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие FIXFc-sc и Fc-sc, представлены в виде SEQ ID №:1 и SEQ ID №:3, соответственно.

**[0076]** В некоторых вариантах реализации изобретения участок фактора IX в rFIXFc имеет первичную аминокислотную последовательность, идентичную аллельной форме полученного из плазмы фактора IX с треонином в положении 148, и структурные и функциональные характеристики, подобные эндогенному фактору IX. Домен Fc в rFIXFc включает шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG1. Зрелая форма объединенного гетеродимера rFIXFc содержит 869 аминокислот и имеет молекулярную массу приблизительно 98 килодальтон. В некоторых вариантах реализации изобретения

полипептид rFIXFc содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 %, 95 % или 100 % идентичную аминокислотам 1-642 последовательности SEQ ID №:2

**[0077]** В одном варианте реализации изобретения второй фрагмент, слитый с FIX, представляет собой партнера по связыванию FcRn. В другом варианте реализации изобретения партнер по связыванию FcRn, слитый с FIX, представляет собой фрагмент Fc. Партнер по связыванию FcRn представляет собой любую молекулу, которая может специфически связываться с рецептором FcRn с последующей активной транспортировкой посредством рецептора FcRn партнера по связыванию FcRn. Таким образом, термин Fc включает любые варианты IgG Fc, которые являются функциональными. Область участка Fc IgG, которая связывается с рецептором FcRn, была описана на основе рентгеновской кристаллографии (Burmeister *et al.*, *Nature* 372:379 (1994), включенная в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Основная площадь контакта Fc с FcRn находится рядом с местом соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn находятся в пределах одной тяжелой цепи Ig. Партнеры по связыванию FcRn включают, например, цельный IgG, фрагмент Fc IgG и другие фрагменты IgG, которые имеют полную область связывания FcRn. Основные контактные сайты включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3. Упомянутая нумерация аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулинов, или областей иммуноглобулинов основана на работе Kabat *et al.* 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda, MD, включенной в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Рецептор FcRn был получен от нескольких видов млекопитающих, включая человека. Известны последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши (Story *et al.*, *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994), включенная в данный документ в полном объеме посредством ссылки.) Fc может содержать домены CH2 и CH3 иммуноглобулина с шарнирной областью иммуноглобулина или без нее. Типовые варианты Fc представлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0078]** Fc (или участок Fc химерного полипептида) может содержать одну или более мутаций и комбинации мутаций.

**[0079]** Fc (или участок Fc химерного полипептида) может содержать мутации, которые обеспечивают увеличение периода полувыведения, такие как M252Y, S254T, T256E и их комбинации, что описано в Oganessian *et al.*, *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки; H433K, N434F и их комбинации, что описано в Vaccaro *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005), которая

включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки; мутанты описаны на страницах 1-2, абзац [0012] и в примерах 9 и 10 US 2009/0264627 A1, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки; также мутанты описаны на странице 2, абзацы [0014]-[0021] US 20090163699 A1, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0080]** Fc (или участок Fc химерного полипептида) может также содержать, например, следующие мутации. Фрагмент Fc IgG может быть изменен в соответствии с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и тому подобное, чтобы получить модифицированный IgG или фрагменты Fc, или их части, которые будут связываться с FcRn. Такие модификации включают, например, модификации сайтов, удаленных от контакта с FcRn, а также модификации в пределах сайтов контакта, которые сохраняют или даже усиливают связывание с FcRn. Например, следующие остатки из одной аминокислоты в Fc IgG1 человека (Fc $\gamma$ 1) могут быть заменены без существенной потери аффинности связывания Fc с 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 замену пролина дикого типа на аланин в положении номер 238. Аминокислоты дикого типа могут быть заменены на другие аминокислоты, в дополнение к аланину, в положениях, указанных выше. Мутации могут быть внесены в Fc по одной, приводя к образованию более ста партнеров связывания FcRn, отличных от нативного Fc. Дополнительно, комбинации из двух, трех или более этих отдельных мутаций могут быть введены вместе, приводя к образованию еще сотен партнеров по связыванию FcRn. Некоторые из этих мутаций могут придавать новые функциональные возможности партнеру по связыванию FcRn. Например, один вариант реализации изобретения включает в себя мутацию N297A, удаляющую высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Эффектом этой мутации является снижение иммуногенности, тем самым увеличивается период полувыведения из крови партнера по связыванию FcRn, и получение партнера по связыванию FcRn, который неспособен к связыванию с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB и

FcγRIIIA, без ущерба для аффинности к FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Дополнительно, по меньшей мере три гамма-рецептора Fc человека, по-видимому, распознают сайт связывания на IgG в нижней шарнирной области, который, как правило, соответствует аминокислотам 234-237. Таким образом, еще один пример новых функциональных возможностей и потенциального снижения иммуногенности может появиться из-за мутаций в этой области, как, например, путем замены аминокислот 233-236 IgG1 человека «ELLG» на соответствующую последовательность из IgG2 «PVA» (с удалением одной аминокислоты). Как было показано, FcγRI, FcγRII и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1, когда введены такие мутации (Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77 (1995), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки; и Armour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:2613 (1999), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Дополнительным примером новых функциональных возможностей, появляющихся из-за мутаций, описанных выше, является то, что в некоторых случаях аффинность к FcRn может быть увеличена сверх уровня дикого типа. Эта повышенная аффинность может отражать увеличение скорости ассоциации, уменьшение скорости диссоциации или как увеличение скорости ассоциации, так и уменьшение скорости диссоциации. Мутации, которые, как полагают, придают повышенную аффинность к FcRn, включают, например, T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591 (2001), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

**[0081]** Fc (или участок Fc химерного полипептида) может быть по меньшей мере на около 60 %, около 70 %, около 80 %, около 90 %, около 95 %, около 96 %, около 97 %, около 98 %, около 99 % или около 100 % идентичным аминокислотной последовательности Fc, показанной в Таблице 14 (например, аминокислоты 21-247 SEQ ID №: 4). Fc (или участок Fc химерного полипептида) может быть идентичным аминокислотной последовательности Fc, показанной в Таблице 14 (например, аминокислоты 21-247 SEQ ID №: 4).

**[0082]** Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают FIX, слитый с одним или более полипептидами альбуминами, полипептидами, связывающими альбумин, или малыми молекулами, связывающими альбумин. В одном варианте реализации изобретения альбумин представляет собой альбумин человека. Альбумин или белок, связывающий альбумин, может быть присоединен к N-концу FIX или

С-концу FIX или вставлен между двумя аминокислотами в FIX. Примеры альбуминов, например, их фрагментов, которые можно использовать в настоящем изобретении, известны и приведены, например, в патенте США № 7592010; патенте США № 6686179; и Schulte, *Thrombosis Res.* 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009), каждый из которых включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0083]** Полипептиды, связывающие альбумин, могут включать, без ограничения, бактериальные альбумин-связывающие домены, альбумин-связывающие пептиды или альбумин-связывающие фрагменты антител, которые могут связываться с альбумином. Домен 3 из стрептококкового белка G, как описано в Kraulis *et al.*, *FEBS Lett.* 378:190-194 (1996) и Linhult *et al.*, *Protein Sci.* 11:206-213 (2002), являются примером бактериального домена, связывающего альбумин. Примеры альбумин-связывающих пептидов включают ряд пептидов, имеющих сердцевиновую последовательность DICLPRWGCLW (SEQ ID №: 5). См., например, Dennis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 35035-35043 (2002). Примеры альбумин-связывающих фрагментов антител описаны в Muller and Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:319-326 (2007); Rooverset *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 56:303-317 (2007) и Holt *et al.*, *Prot. Eng. Design Sci.*, 21:283-288 (2008), которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0084]** В некоторых аспектах изобретения рекомбинантный полипептид FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один сайт присоединения для малой молекулы, не являющейся полипептидом, варианта или производного, которые могут связываться с альбумином. Примером таких альбумин-связывающих фрагментов является 2-(3-малеимидопропанамидо)-6-(4-(4-иодфенил)бутанамидо)гексаноат (обозначение «Albu»), как описано в Trusselet *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009).

**[0085]** Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают FIX, слитый с по меньшей мере одним С-концевым пептидом (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека или ее фрагмента, варианта или производного. СТР может быть присоединен к FIX или через N-конец FIX, или через С-конец FIX. Известно, что один или более пептидов СТР, присоединенных к или вставленных в рекомбинантный белок, увеличивают *in vivo* период полувыведения этого белка. См., например, патент США № 5712122, включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Типичные пептиды СТР включают DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPRLPGPSDTPIL (SEQ ID №: 6) или SSSSKAPPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID №: 7). См., например, публикацию заявки на патент США № US 2009/0087411 A1, включенную посредством ссылки.

**[0086]** Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают FIX, слитой с по меньшей мере одной последовательностью PAS или ее фрагментом, вариантом или производным. Последовательность PAS может быть присоединена или к N-концу FIX, или к C-концу FIX. Пептид PAS или последовательность PAS, при использовании в данном документе, обозначает аминокислотную последовательность, содержащую в основном остатки аланина и серина или содержащую в основном остатки аланина, серина и пролина, причем в физиологических условиях аминокислотная последовательность пребывает в конформации статистической спирали. Следовательно, последовательность PAS представляет собой строительный блок, полимер из аминокислот или кассету последовательностей, содержащую, в основном состоящую из или состоящую из аланина, серина и пролина, которую можно использовать в качестве составляющей гетерологичного фрагмента в химерном белке. Полимер из аминокислот также может пребывать в конформации статистической спирали, когда в последовательность PAS в качестве неосновного компонента добавлены отличные от аланина, серина и пролина остатки. Под «неосновным компонентом» подразумевают, что отличные от аланина, серина и пролина аминокислоты можно добавлять в последовательность PAS до определенного уровня, например, до около 12 %, *т.е.* около 12 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 10 %, до около 9 %, до около 8 %, около 6 %, около 5 %, около 4 %, около 3 %, *т.е.* около 2 % или около 1 % аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val. В физиологических условиях пептид PAS пребывает в конформации статистической спирали и таким образом может опосредовать повышение *in vivo* и/или *in vitro* стабильности рекомбинантного белка по данному изобретению и обладает прокоагулянтной активностью.

**[0087]** Неограничивающие примеры пептидов PAS включают ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID №: 8), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID №: 9), APSSPSPAPSSPSPASPSS (SEQ ID №: 10), APSSPSPAPSSPSPASPS (SEQ ID №: 11), SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID №: 12), AASPAAPSAPPAASPAAPSAPPA (SEQ ID №: 13), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID №: 14) или любые их варианты, производные, фрагменты или их комбинации. Дополнительные примеры последовательностей PAS представлены, например, в публикации патента США № 2010/0292130 A1, публикации заявки PCT № WO 2008/155134 A1 и в Европейском выданном патенте № EP2173890.

**[0088]** Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают FIX, слитый с по меньшей мере одним пептидом трансферрином или его фрагментом, вариантом или производным. По меньшей мере один пептид трансферрин может быть присоединен или к N-концу FIX, или к C-концу FIX или вставлен между двумя аминокислотами в FIX. Любой трансферрин может быть присоединен к или вставлен в рекомбинантный белок FIX по данному изобретению. Например, Tf человека дикого типа (Tf) представляет собой белок из 679 аминокислот массой приблизительно 75 кДа (не учитывая гликозилирование) с двумя основными доменами: N (около 330 аминокислот) и C (около 340 аминокислот), которые, по видимому, появляются из-за дубликации гена. См. номера доступа NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM039847 и S95936 в базе данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), каждый из которых включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0089]** Трансферрин транспортирует железо посредством эндоцитоза, опосредованного трансферриновым рецептором (TfR). После высвобождения железа в эндосомальный компартмент и возвращения комплекса Tf-TfR к поверхности клетки, Tf высвобождается назад во внеклеточное пространство для следующего цикла транспортирования железа. Tf имеет большой период полувыведения, который составляет более 14-17 дней (Li *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002)). Для гибридных белков, содержащих трансферрин, изучали возможность увеличения периода полувыведения, целевой доставки при лечении рака, пероральной доставки и длительной активации проинсулина (Brandsma *et al.*, *Biotechnol. Adv.*, 29: 230-238 (2011); Bai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292-7296 (2005); Kim *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682-692 (2010); Wang *et al.*, *J. Controlled Release* 155:386-392 (2011)).

**[0090]** Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают FIX, слитый с по меньшей мере одним фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ).

**[0091]** Пегилированный FIX может относиться к конъюгату, который образуется между FIX и по меньшей мере одной молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ коммерчески доступен с различными молекулярными массами и интервалами средних молекулярных масс. Типичные примеры интервалов средних молекулярных масс ПЭГ включают, но не ограничиваясь ими, около 200, около 300, около 400, около 600, около 1000, около 1300-1600, около 1450, около 2000, около 3000, около 3000-3750, около 3350, около 3000-7000, около 3500-4500, около 5000-7000, около 7000-9000, около 8000, около 10000, около 8500-11500, около 16000-24000, около 35000, около 40000, около 60000 и около 80000 дальтон. Эти средние молекулярные массы представлены только в качестве примеров и не имеют ограничивающего характера.



**[0092]** Рекомбинантный белок FIX длительного действия по данному изобретению может быть пегилированным таким образом, что включает один или несколько (например, 2-4) фрагментов ПЭГ. Пегилирование можно осуществить с помощью любой из известных в данной области техники реакций пегилирования. Способы получения пегилированных производных белков обычно включают: (a) приведение в контакт полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционно-способный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, в которых пептид по данному изобретению присоединяется к одной или более группам ПЭГ; и (ii) получение продукта(-ов) реакции. Как правило, оптимальные условия реакции определяют для каждого случая отдельно на основании известных параметров и требуемого результата.

**[0093]** Существует ряд способов присоединения ПЭГ, доступных специалистам в данной области, например Malik F *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992); публикации европейских патентов № EP0401384, EP0154316 и EP0401384; и публикации международных заявок на патенты № WO92/16221 и WO95/34326. В качестве неограничивающего примера варианты FIX могут содержать замены на цистеин в одном или более сайтах встраивания в FIX, и эти остатки цистеина могут быть дополнительно присоединены к полимеру ПЭГ. См. Mei *et al.*, *Blood* 116:270-279 (2010) и патент США № 7632921, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[0094]** Как обсуждалось выше, типовые полипептиды длительного действия также включают FIX, слитый с по меньшей мере одним полимером гидроксиэтиловым крахмалом (ГЭК). ГЭК представляет собой производное природного амилопектина и расщепляется в организме под действием альфа-амилазы. ГЭК демонстрирует полезные биологические свойства и используется в лечебных учреждениях качестве агента, восстанавливающего объем крови, и при гемодилюции. См., например, Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987); и Weidler *et al.*, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991).

**[0095]** ГЭК характеризуется главным образом распределением молекулярных масс и степенью замещения. ГЭК имеет среднюю молекулярную массу (взвешенное среднее) от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа или от 4 до 70 кДа. Гидроксиэтиловый крахмал может дополнительно характеризоваться мольной степенью замещения, которая составляет от 0,1 до 3, от 0,1 до 2, от 0,1 до 0,9 или от 0,1 до 0,8, а соотношение между C2:C6 замещением находится в интервале от 2 до 20 применительно к гидроксиэтильным группам. ГЭК со средней молекулярной массой около 130 кДа представляет собой VOLUVEN<sup>®</sup> производства Fresenius. VOLUVEN<sup>®</sup> представляет собой искусственный коллоид,

применяемый, например, для восполнения объемов жидкостей при наличии показаний при лечении и профилактике гиповолемии. Существует ряд способов присоединения ГЭК, доступных специалистам в данной области техники, например, аналогичные способам присоединения ПЭК, описанным выше.

**[0096]** Коагулирующая активность фактора IX выражена в международных единицах (МЕ). Одна МЕ активности фактора IX примерно соответствует количеству фактора IX в одном миллилитре нормальной плазмы человека. Для измерения активности фактора IX существует несколько методов, в том числе одноступенчатый анализ свертывания (активированное частичное тромбопластиновое время; АЧТВ), тест генерации тромбина (ТГТ) и ротационная тромбоэластометрия (ROTEM®).

### ***Буферные агенты***

**[0097]** Буферные агенты, пригодные для настоящего изобретения, могут представлять собой слабую кислоту или основание, используемую для поддержания кислотности (рН) раствора, близкой к выбранной величине, после добавления другой кислоты или основания. Пригодные буферные агенты могут увеличивать стабильность фармацевтических составов путем поддержания постоянного рН состава. Пригодные буферные агенты также могут обеспечивать физиологическую совместимость или оптимизировать растворимость. Реологические, вязкостные и другие свойства могут также зависеть от рН состава. Общеизвестные буферные агенты включают, но не ограничиваясь ими, гистидин, цитрат, сукцинат, ацетат и фосфат. В некоторых вариантах реализации изобретения буферный агент включает L-гистидин или смеси L-гистидина и L-гистидина гидрохлорида с агентами, обеспечивающими изотоничность раствора, причем рН возможно регулировать кислотой или основанием, известными в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения буферный агент представляет собой L-гистидин. В некоторых вариантах реализации изобретения рН состава поддерживают между около 6 и около 8 или между около 6,5 и около 7,5.

### ***Стабилизирующие агенты***

**[0098]** Стабилизирующие агенты добавляют в фармацевтический препарат для того, чтобы стабилизировать этот препарат. Такие агенты могут стабилизировать белки несколькими различными способами. Общеизвестные стабилизирующие агенты включают, но не ограничиваясь ими, аминокислоты, такие как глицин, аланин, лизин, аргинин или треонин, углеводы, такие как глюкоза, сахароза, трегалоза, рафиноза или мальтоза, многоатомные спирты, такие как глицерин, маннит, сорбит, циклодекстрины или

декстраны любого вида и с любой молекулярной массой, или ПЭГ. В одном аспекте изобретения стабилизирующий агент выбирают так, чтобы максимально увеличить стабильность полипептида FIX в лиофилизированных препаратах. В некоторых вариантах реализации изобретения стабилизирующий агент представляет собой сахарозу.

### ***Объемообразующие агент***

**[0099]** Объемообразующие агенты Объемообразующие агенты можно добавлять в фармацевтический препарат для того, чтобы увеличить объем и массу препарата, облегчая его точное дозирование и обращение с ним. Общеизвестные объемообразующие агенты включают, но не ограничиваясь ими, лактозу, сахарозу, глюкозу, маннит, сорбит, карбонат кальция или стеарат магния. В некоторых вариантах реализации изобретения объемообразующий агент представляет собой маннит.

### ***Поверхностно-активные вещества***

**[0100]** Поверхностно-активные вещества представляют собой амфифильные вещества с лиофильной и лиофобной группами. Поверхностно-активное вещество может быть анионным, катионным, цвиттер-ионным или неионогенным. Примеры неионогенных поверхностно-активных веществ включают, но не ограничиваясь ими, алкилэтоксилат, нонилфенолэтоксилат, аминэтоксилат, полиэтиленоксид, полипропиленоксид, жирные спирты, такие как цетиловый спирт или олеиловый спирт, кокамид МЭА, кокамид ДЭА, полисорбаты или додецилдиметиламиноксид. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80.

### ***Прелиофилизационный состав***

**[0101]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен прелиофилизационный состав, содержащий:

- (a) полипептид фактор IX (FIX) с коагулирующей активностью FIX;
- (b) буферный агент;
- (c) стабилизирующий агент;
- (d) объемообразующий агент; и
- (e) поверхностно-активное вещество,

причем номинальный объем состава составляет менее около 5 мл, менее около 4 мл или менее около 3 мл, а каждый из (a) – (e) присутствует в количестве на флакон (мг/флакон), достаточном для обеспечения:

- (1) повышения стабильности полипептида FIX после лиофилизации;
- (2) уменьшения времени восстановления после лиофилизации;
- (3) уменьшения разбрызгивания на пробку флакона, содержащего состав;
- (4) уменьшения времени цикла лиофилизации;
- (5) увеличения срока хранения лиофилизата, полученного из прелиофилизационного состава, при комнатной температуре; или
- (6) любых их комбинаций,

по сравнению с контрольным прелиофилизационным составом,

причем контрольный состав содержит (а) – (е) в количествах на флакон, идентичных данному прелиофилизационному составу, но номинальный объем составляет по меньшей мере 5 мл. В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем для контрольного состава составляет 5,3 мл или 5 мл.

**[0102]** В других вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять характеристик, выбранных из (1) повышенной стабильности полипептида FIX после лиофилизации; (2) уменьшенного времени восстановления после лиофилизации; (3) уменьшенного разбрызгивания на пробку флакона, содержащего состав; (4) уменьшенного времени цикла лиофилизации; и (5) увеличенного срока хранения лиофилизата, полученного из прелиофилизационного состава, при комнатной температуре. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает (1) повышение стабильности полипептида FIX после лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает (2) уменьшение времени восстановления после лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает (3) уменьшение разбрызгивания на пробку флакона, содержащего состав. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает (4) уменьшение времени цикла лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает (5) увеличение срока хранения лиофилизата, полученного из прелиофилизационного состава, при комнатной температуре. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав обеспечивает (6) любую комбинацию характеристик, описанных в данном документе.

**[0103]** В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит по меньшей мере около 100 МЕ/флакон полипептида FIX. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит по меньшей мере от около 200 МЕ/флакон до около 10000 МЕ/флакон полипептида FIX, от около 200

МЕ/флакон до около 6000 МЕ/флакон или от около 500 МЕ/флакон до около 5000 МЕ/флакон. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит по меньшей мере около 220 МЕ/флакон, около 250 МЕ/флакон, около 300 МЕ/флакон, около 400 МЕ/флакон, около 500 МЕ/флакон, около 600 МЕ/флакон, около 700 МЕ/флакон, около 800 МЕ/флакон, около 900 МЕ/флакон, около 1000 МЕ/флакон, около 1100 МЕ/флакон, около 1200 МЕ/флакон, около 1300 МЕ/флакон, около 1400 МЕ/флакон, около 1500 МЕ/флакон, около 2000 МЕ/флакон, около 2500 МЕ/флакон, около 3000 МЕ/флакон, около 4000 МЕ/флакон, около 5000 МЕ/флакон, около 5500 МЕ/флакон, около 6000 МЕ/флакон, около 6500 МЕ/флакон, около 7000 МЕ/флакон, около 7500 МЕ/флакон, около 8000 МЕ/флакон, около 8500 МЕ/флакон, около 9000 МЕ/флакон, около 9500 МЕ/флакон или около 10000 МЕ/флакон полипептида FIX.

**[0104]** В некоторых вариантах реализации изобретения более высокая концентрация в прелиофилизационном составе достигается уменьшением объема наполнения. В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем прелиофилизационного состава составляет около 4,0 мл, около 3,5 мл, около 3,0 мл, около 2,9 мл, около 2,8 мл, около 2,7 мл, около 2,65 мл, около 2,6 мл, около 2,5 мл, около 2,4 мл, около 2,3 мл, около 2,2 мл, около 2,1 мл или около 2,0 мл. В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем прелиофилизационного состава составляет около 2,65 мл. В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем прелиофилизационного состава составляет менее около 5 мл.

**[0105]** В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид FIX может быть дополнительно сконцентрирован с помощью еще одной стадии очистки, например, второй стадии ультрафильтрации.

**[0106]** В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенное время восстановления составляет менее 1,5 минут, менее 1 минуты, менее 50 секунд, менее 40 секунд, менее 30 секунд, менее 20 секунд или менее 10 секунд. В конкретных вариантах реализации изобретения уменьшенное время восстановления составляет менее 30 секунд.

**[0107]** В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенное время цикла лиофилизации прелиофилизационного состава составляет около 4 дней или менее, около 3 дней или менее, около 2 дней или менее или около 1 дня или менее.

**[0108]** В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация буферного агента в прелиофилизационном составе составляет от около 3 мг/мл до около 15 мг/мл, от 4 мг/мл до около 12 мг/мл, от около 5 мг/мл до около 10 мг/мл или от около 5,82 мг/мл до около 9,7 мг/мл. В одном варианте реализации изобретения буферный агент присутствует в концентрации от около 3,88 мг/мл до около 9,7 мг/мл. В одном варианте реализации

изобретения буферный агент присутствует в концентрации около 7,76 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит L-гистидин в концентрации около 7,76 мг/мл.

**[0109]** В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация стабилизирующего агента в прелиофилизационном составе составляет от около 10 мг/мл до около 50 мг/мл, от около 13 мг/мл до около 40 мг/мл, от около 15 мг/мл до около 35 мг/мл или от около 17,85 мг/мл до около 29,95 мг/мл. В одном варианте реализации изобретения буферный агент присутствует в концентрации около 23,8 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит сахарозу в концентрации 23,8 мг/мл.

**[0110]** В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация объемобразующего агента в прелиофилизационном составе составляет от около 20 мг/мл до около 100 мг/мл, от около 30 мг/мл до около 70 мг/мл, от около 30 мг/мл до около 60 мг/мл или от около 35,7 мг/мл до около 59,5 мг/мл. В одном варианте реализации изобретения объемобразующий агент присутствует в концентрации около 47,6 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит маннит в концентрации около 47,6 мг/мл.

**[0111]** В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества в прелиофилизационном составе составляет от около 0,01 мг/мл до около 5 мг/мл, от около 0,1 мг/мл до около 4 мг/мл, от около 0,1 мг/мл до около 3 мг/мл, от около 0,01 мг/мл до около 2 мг/мл или от около 0,05 мг/мл до около 1 мг/мл. В одном варианте реализации изобретения поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации около 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав содержит полисорбат 20 или полисорбат 80 в концентрации около 0,2 мг/мл.

**[0112]** В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полипептида FIX в прелиофилизационном составе составляет от около 80 МЕ/мл до около 2750 МЕ/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полипептида FIX в прелиофилизационном составе составляет по меньшей мере около 100 МЕ/мл, по меньшей мере около 200 МЕ/мл, по меньшей мере около 300 МЕ/мл, по меньшей мере около 400 МЕ/мл, по меньшей мере около 500 МЕ/мл, по меньшей мере около 600 МЕ/мл, по меньшей мере около 700 МЕ/мл, по меньшей мере около 800 МЕ/мл, по меньшей мере около 900 МЕ/мл, по меньшей мере около 1000 МЕ/мл, по меньшей мере около 1500 МЕ/мл, по меньшей мере около 2000 МЕ/мл или по меньшей мере около 2500 МЕ/мл.

**[0113]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен прелиофилизационный состав, содержащий:

- (a) от около 80 до около 2750 МЕ/мл rFIXFc;
- (b) около 7,76 мг/мл L-гистидина;
- (c) около 47,6 мг/мл маннита;
- (d) около 23,8 мг/мл сахарозы; и
- (e) около 0,2 мг/мл полисорбата 20.

**[0114]** В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем такого прелиофилизационного состава составляет около 3 мл, около 2,9 мл, около 2,8 мл, около 2,7 мл, около 2,65 мл, около 2,6 мл, около 2,5 мл, около 2,4 мл, около 2,3 мл, около 2,2 мл, около 2,1 мл или около 2,0 мл. В одном варианте реализации изобретения номинальный объем такого прелиофилизационного состава составляет около 2,65 мл.

**[0115]** Дополнительно, в данном изобретении предложен лиофилизированный порошок, который получен лиофилизацией любых вышеприведенных прелиофилизационных составов. В некоторых вариантах реализации изобретения прелиофилизационный состав представляет собой любой состав, описанный в данном документе.

### ***Ллиофилизированный порошок***

**[0116]** В данном изобретении также предложен лиофилизированный порошок, содержащий полипептид FIX, буферный агент, стабилизирующий агент, объемообразующий агент, поверхностно-активное вещество или любую их комбинацию.

**[0117]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит от около 8 мг до около 39 мг на флакон, от около 9 мг до около 35 мг на флакон, от около 10 мг до около 30 мг на флакон, от около 12 мг до около 25 мг на флакон, от около 15 мг до около 23 мг на флакон буферного агента (например, L-гистидина). В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 25 мг на флакон, около 24 мг на флакон, около 23 мг на флакон, около 22 мг на флакон, около 21 мг на флакон, около 20 мг на флакон, около 19 мг на флакон, около 18 мг на флакон, около 17 мг на флакон, около 16 мг на флакон, около 15 мг на флакон буферного агента. В другом варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 20,6 мг на флакон буферного агента. В некоторых вариантах реализации изобретения буферный агент представляет собой L-гистидин.

**[0118]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит от около 27 мг до около 132 мг на флакон, от около 30 мг до около 120

мг на флакон, от около 40 мг до около 110 мг на флакон, от около 50 мг до около 100 мг на флакон, от около 60 мг до около 90 мг на флакон стабилизирующего агента. В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 68 мг на флакон, около 67 мг на флакон, около 66 мг на флакон, около 65 мг на флакон, около 64 мг на флакон, около 63 мг на флакон, около 62 мг на флакон, около 61 мг на флакон, около 60 мг на флакон, около 59 мг на флакон стабилизирующего агента. В другом варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 63,1 мг на флакон стабилизирующего агента. В некоторых вариантах реализации изобретения стабилизирующий агент представляет собой сахарозу.

**[0119]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит от около 50 мг до около 265 мг на флакон, от около 53 мг до около 265 мг на флакон, от около 50 мг до около 250 мг на флакон, от около 53 мг до около 265 мг на флакон, от около 80 мг до около 200 мг на флакон, от около 100 мг до около 150 мг на флакон или от около 110 мг до около 140 мг на флакон объемообразующего агента. В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 131 мг на флакон, около 130 мг на флакон, около 129 мг на флакон, около 128 мг на флакон, около 127 мг на флакон, около 126 мг на флакон, около 125 мг на флакон, около 124 мг на флакон, около 123 мг на флакон или около 122 мг на флакон объемообразующего агента. В другом варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 126,1 мг на флакон объемообразующего агента. В некоторых вариантах реализации изобретения объемообразующий агент представляет собой маннит.

**[0120]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит от около 0,03 мг до около 13 мг на флакон, от около 0,05 мг до около 10 мг на флакон, от около 0,07 мг до около 8 мг на флакон, от около 0,1 мг до около 2 мг на флакон поверхностно-активного вещества. В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 1 мг на флакон, около 0,9 мг на флакон, около 0,8 мг на флакон, около 0,7 мг на флакон, около 0,6 мг на флакон, около 0,5 мг на флакон, около 0,4 мг на флакон, около 0,3 мг на флакон, около 0,2 мг на флакон или около 0,1 мг на флакон поверхностно-активного вещества. В другом варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 0,5 мг на флакон поверхностно-активного вещества. В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит около 0,53 мг на флакон поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80.



**[0121]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит:

- (a) полипептид FIX в количестве от около 2 мг на флакон до около 150 мг на флакон;
- (b) буферный агент в количестве от около 10 мг на флакон до около 30 мг на флакон.
- (c) объемообразующий агент в количестве от около 70 мг на флакон до около 200 мг на флакон;
- (d) стабилизирующий агент в количестве от около 30 мг на флакон до около 100 мг на флакон; и
- (e) поверхностно-активное вещество в количестве от около 0,05 мг на флакон до около 5 мг на флакон.

**[0122]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит:

- (a) полипептид FIX в количестве от около 2,2 мг на флакон до около 125 мг на флакон;
- (b) буферный агент в количестве от около 8 мг на флакон до около 39 мг на флакон;
- (c) объемообразующий агент в количестве от около 53 мг на флакон до около 265 мг на флакон;
- (d) стабилизирующий агент в количестве от около 27 мг на флакон до 132 мг на флакон;
- и
- (e) поверхностно-активное вещество в количестве от около 0,03 мг на флакон до около 13 мг на флакон.

**[0123]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит:

- (a) лиофилизированный полипептид FIX в количестве от около 2,2 мг на флакон до около 125 мг на флакон;
- (b) буферный агент в количестве от около 12,5 мг на флакон до около 25 мг на флакон;
- (c) стабилизирующий агент в количестве от около 32,5 мг на флакон до около 80 мг на флакон;
- (d) объемообразующий агент в количестве от около 75 мг на флакон до 150 мг на флакон; и
- (e) поверхностно-активное вещество в количестве от около 0,1 мг/мл до около 2 мг/мл.

**[0124]** В одном варианте реализации изобретения лиофилизированный порошок содержит:

- (a) от около 2,2 до около 125 мг/флакон полипептида FIX;
- (b) около 20,6 мг/флакон L-гистидина;
- (c) около 126,1 мг/флакон маннита;

- (d) около 63,1 мг/флакон сахарозы; и
- (e) около 0,53 мг/флакон полисорбата 20.

### ***Восстановленный состав***

**[0125]** Кроме того, в изобретении предложен восстановленный состав, содержащий любой вышеописанный лиофилизированный порошок, восстановленный с помощью восстанавливающего буферного раствора.

**[0126]** В некоторых вариантах реализации изобретения восстанавливающий буферный раствор представляет собой раствор NaCl. В некоторых вариантах реализации изобретения объем восстанавливающего буферного раствора составляет 5 мл.

**[0127]** В некоторых вариантах реализации изобретения восстановленный состав содержит:

- (a) полипептид FIX в концентрации от около 0,9 мг/мл до около 50 мг/мл;
- (b) буферный агент в концентрации от 2 мг/мл до около 5 мг/мл;
- (c) объемобразующий агент в концентрации от 20 мг/мл до около 30 мг/мл;
- (d) стабилизирующий агент в концентрации от 8 мг/мл до 15 мг/мл на флакон; и
- (e) поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,05 мг/мл до около 0,4 мг/мл.

**[0128]** В некоторых вариантах реализации изобретения восстановленный состав содержит:

- (a) полипептид FIX в концентрации от около 0,9 мг/мл до около 50 мг/мл;
- (b) буферный агент в концентрации около 3,88 мг/мл;
- (c) объемобразующий агент в концентрации около 23,8 мг/мл;
- (d) стабилизирующий агент в концентрации около 11,9 мг/мл;
- (e) поверхностно-активное вещество в концентрации около 0,1 мг/мл; и
- (f) восстанавливающий буферный раствор, содержащий около 3,25 мг/мл NaCl.

**[0129]** В некоторых вариантах реализации изобретения восстановленный состав содержит:

- (a) полипептид FIX в концентрации от около 80 МЕ/мл до около 2750 МЕ/мл;
- (b) буферный агент в концентрации около 25 мМ;
- (c) объемобразующий агент в концентрации около 131 мМ;
- (d) стабилизирующий агент в концентрации около 35 мМ;
- (e) поверхностно-активное вещество в концентрации 0,01 % (масса/объем); и
- (f) восстанавливающий буферный раствор.

**[0130]** Примеры композиций составов дополнительно представлены в Таблицах 2-4.

**[0131]** В одном аспекте в изобретении дополнительно предложен флакон, содержащий прелиофилизационные составы, лиофилизированный порошок или восстановленные составы, описанные в данном документе.

**[0132]** В другом аспекте в изобретении предложен набор, включающий первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок, описанный в данном документе, и второй контейнер, содержащий восстанавливающий буферный раствор в объеме, достаточном для получения восстановленного состава при объединении с лиофилизированным порошком первого контейнера. В некоторых вариантах реализации изобретения объем восстанавливающего буферного раствора в наборе составляет 5 мл. В некоторых вариантах реализации изобретения объем составляет около 5,3 мл. В некоторых вариантах реализации изобретения восстанавливающий буферный раствор набора содержит NaCl. В некоторых вариантах реализации изобретения набор применяют для лечения гемофилии В.

**[0133]** Еще в одном аспекте в изобретении предложен способ введения полипептида FIX пациенту с гемофилией В, нуждающемуся в этом, включающий введение пациенту восстановленного состава, описанного в данном документе, причем введение предупреждает приступы кровотечения у пациента или уменьшает их частоту или тяжесть.

**[0134]** В изобретении дополнительно предложен способ профилактики, лечения, облегчения или регулирования гемофилии В у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение восстановленного состава, описанного в данном документе.

### *Способы получения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX*

**[0135]** В изобретении предложены способы получения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX. В одном аспекте в изобретении предложены способы лиофилизации, включающие лиофилизацию прелиофилизационных составов, описанных в данном документе. В другом аспекте в изобретении предложен способ лиофилизации, включающий одну стадию сушки.

**[0136]** В одном аспекте в изобретении предложен способ лиофилизации полипептида FIX, включающий:

- (a) «стадию замораживания», включающую замораживание прелиофилизационного состава, содержащего полипептид FIX и водный растворитель;
- (b) «стадию вакуумирования», включающую уменьшение давления в камере с замороженным прелиофилизационным составом, достаточное для удаления водного растворителя из замороженного прелиофилизационного состава; и

(с) одну «стадию сушки», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава выше температуры коллапса, что приводит к получению лиофилизированного порошка. В другом аспекте изобретения продолжительность процесса лиофилизации уменьшена по сравнению с контрольным способом, например, процессом лиофилизации с двумя или более стадиями сушки.

**[0137]** В других аспектах изобретения лиофилизированный порошок, полученный с помощью настоящего способа, имеет одну или более из следующих характеристик: (1) повышенной стабильности полипептида FIX; (2) уменьшенного времени восстановления; (3) уменьшенного разбрызгивания на пробку флакона, содержащего состав; или (4) увеличенного срока хранения лиофилизированного порошка при комнатной температуре.

**[0138]** В некоторых вариантах реализации изобретения температура коллапса составляет  $-1,5^{\circ}\text{C}$ .

**[0139]** В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии замораживания прелиофилизационный состав заморожен до температуры замораживания, которая составляет от около  $-65$  до около  $-40^{\circ}\text{C}$ , от около  $-65$  до около  $-45^{\circ}\text{C}$ , от около  $-65$  до около  $-55^{\circ}\text{C}$ , от около  $-60$  до около  $-40^{\circ}\text{C}$ , от около  $-60$  до около  $-50^{\circ}\text{C}$  или от около  $-60$  до около  $-55^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии замораживания прелиофилизационный состав заморожен до температуры замораживания около  $-55^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии замораживания температуру замораживания понижают от около  $5^{\circ}\text{C}$  до около  $-55^{\circ}\text{C}$ .

**[0140]** В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии замораживания температуру замораживания поддерживают на протяжении от около 30 минут до около 5 часов, от около 1 часа до около 5 часов, от около 1,5 часов до около 5 часов, от около 1,5 часов до около 4 часов, от около 1,5 часов до около 3 часов или от около 1,5 часов до 2,5 часов. В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии замораживания температуру замораживания поддерживают на протяжении около 2 часов.

**[0141]** В некоторых вариантах реализации изобретения замороженный прелиофилизационный состав, полученный на стадии (а), дополнительно обрабатывают на «стадии отжига» (а') до «стадии вакуумирования» (b). В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (а), повышают до температуры отжига, которая составляет от около  $-15^{\circ}\text{C}$  до около  $-2^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (а), поднимают до температуры отжига, которая составляет около  $-6^{\circ}\text{C}$ .

**[0142]** В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру отжига поддерживают на протяжении от около 2 часов до около 4 часов. В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру отжига поддерживают на протяжении от около 30 минут до около 5 часов, от около 1 часа до около 5 часов, от около 2 часов до около 5 часов, от около 2 часов до около 4 часов или от около 2,5 часов до 3,5 часов. В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру отжига поддерживают на протяжении около 3 часов.

**[0143]** В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру замороженного прелиофилизационного состава понижают от температуры отжига до температуры, которая составляет от около  $-65^{\circ}\text{C}$  до около  $-40^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии отжига температуру замороженного прелиофилизационного состава понижают от температуры отжига до температуры  $-55^{\circ}\text{C}$ .

**[0144]** В некоторых вариантах реализации изобретения «стадия вакуумирования» включает наложение на замороженный прелиофилизационный состав вакуума, который соответствует давлению от около 0,05 до около 1 мбар, от около 0,05 до около 0,50 мбар, от около 0,10 до около 0,50 мбар, от около 0,15 до около 0,50 мбар, от около 0,20 до около 0,50 мбар или от около 0,25 до около 0,50 мбар. В некоторых вариантах реализации изобретения вакуум на «стадии вакуумирования» соответствует давлению около 0,33 мбар.

**[0145]** В некоторых вариантах реализации изобретения на «стадии вакуумирования» вакуум поддерживают на протяжении около 5 часов, около 4 часов, около 3 часов, около 2 часов или около 1 часа. В некоторых вариантах реализации изобретения на «стадии вакуумирования» вакуум поддерживают на протяжении около 2 часов.

**[0146]** В некоторых вариантах реализации изобретения «стадия сушки» включает повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава от около  $-55^{\circ}\text{C}$  до температуры сушки, которая составляет около  $40^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах реализации изобретения температура сушки составляет по меньшей мере около  $30^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $32^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $34^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $35^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $36^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $38^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $39^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере около  $40^{\circ}\text{C}$ . В других вариантах реализации изобретения температура сушки составляет около  $35^{\circ}\text{C}$ , около  $40^{\circ}\text{C}$ , около  $32^{\circ}\text{C}$  или около  $45^{\circ}\text{C}$ .

**[0147]** В некоторых вариантах реализации изобретения стадия сушки дополнительно включает поддержание температуры сушки на протяжении от около 10 часов до около 40 часов, от около 10 часов до около 30 часов или от около 20 часов до около 30 часов. В некоторых вариантах реализации изобретения температуру сушки поддерживают на протяжении около 25 часов.

**[0148]** В некоторых вариантах реализации изобретения стадию сушки проводят при давлении, которое составляет от около 0,05 до около 1 мбар, от около 0,05 до около 0,50 мбар, от около 0,10 до около 0,50 мбар, от около 0,15 до около 0,50 мбар, от около 0,20 до около 0,50 мбар или от около 0,20 до около 0,45 мбар. В некоторых вариантах реализации изобретения во время стадии сушки поддерживают давление 0,33 мбар. Единицу измерения мбар можно перевести в торр или любые другие единицы. Например, 1 мбар можно перевести в 0,75006375541921 торр.

**[0149]** В одном аспекте в изобретении предложен способ получения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий:

(a) «стадию замораживания», включающую замораживание прелиофилизационного состава, содержащего полипептид FIX, путем понижения температуры в течение около 2 часов до температуры замораживания, которая составляет около  $-55^{\circ}\text{C}$ , и поддержание температуры замораживания в течение 2 часов;

(a') «стадию отжига», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава, полученной на стадии (a), в течение около 1,5 часов до температуры отжига, составляющей около  $-6^{\circ}\text{C}$ , поддержание температуры отжига на протяжении 3 часов, и понижение температуры в течение около 1,5 часов до около  $-55^{\circ}\text{C}$ ;

(b) «стадию вакуумирования», включающую выдерживание замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (a'), при около  $-55^{\circ}\text{C}$  в течение двух часов при атмосферном давлении и понижение давления в течение около 2 часов до около 0,33 мбар; и

(c) одну «стадию сушки», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (b), до около  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 3 часов, при этом поддерживая давление равным около 0,33 мбар, и поддержание температуры замороженного прелиофилизационного состава равной около  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 25 часов, при этом поддерживая давление равным около 0,33 мбар.

что приводит к получению лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах реализации изобретения способ лиофилизации характеризуется меньшим временем цикла.

**[0150]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок, полученный с помощью способов, описанных в данном документе, имеет следующие характеристики:

- (1) повышенную стабильность полипептида FIX;
- (2) уменьшенное время восстановления;
- (3) уменьшения разбрызгивания на пробку флакона, содержащего состав;

(4) увеличенный срок хранения лиофилизированного порошка при комнатной температуре; или

(5) любые их комбинации.

**[0151]** В некоторых вариантах реализации изобретения продолжительность цикла лиофилизации может составлять менее около 4,5 дней, около 4 дней, около 3,5 дней, около 3 дней, около 2,5 дней или около 2 дней. В других вариантах реализации изобретения продолжительность цикла лиофилизации составляет около 3 дней или менее. В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем прелиофилизационного состава, используемый в способе лиофилизации, составляет менее около 5 мл. В некоторых вариантах реализации изобретения номинальный объем составляет около 4 мл, около 3,5 мл, около 3,0 мл, около 2,9 мл, около 2,8 мл, около 2,7 мл, около 2,65 мл, около 2,6 мл, около 2,5 мл, около 2,4 мл, около 2,3 мл, около 2,2 мл, около 2,1 мл или около 2,0 мл. В одном варианте реализации изобретения номинальный объем составляет около 2,65 мл.

**[0152]** В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенное время восстановления лиофилизированного порошка, полученного с помощью способа лиофилизации, составляет менее около 1,5 минут, менее около 1 минуты, менее около 50 секунд, менее около 40 секунд, менее около 30 секунд, менее около 20 секунд или менее около 10 секунд. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенное время восстановления лиофилизированного порошка, полученного с помощью способа лиофилизации, составляет менее около 30 секунд.

**[0153]** В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенное время цикла лиофилизации прелиофилизационного состава, используемого в способе лиофилизации, составляет около 4 дней или менее, около 3 дней или менее, около 2 дней или менее или около 1 дня или менее.

**[0154]** В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок получен из прелиофилизационного состава за около 90 часов или менее, около 80 часов или менее, около 70 часов или менее, около 60 часов или менее, около 50 часов или менее, около 45 часов или менее, около 40 часов или менее или около 30 часов или менее. В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок получен из прелиофилизационного состава за около 45 часов или менее.

**[0155]** В некоторых вариантах реализации изобретения остаточное содержание влаги в лиофилизированном порошке составляет менее около 1,0 %, около 0,7 %, около 0,6 %, около 0,5 %, около 0,4 % или около 0,3 %. В некоторых вариантах реализации изобретения остаточное содержание влаги в лиофилизированном порошке составляет менее около 0,5 %.

**[0156]** В одном аспекте в изобретении предложен способ стабилизации лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем увеличение стабильности лиофилизированного порошка определено с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ) относительно лиофилизированного порошка, приготовленного с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0157]** В другом аспекте в изобретении предложен способ увеличения срока хранения лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем увеличение срока хранения лиофилизированного порошка определено с помощью ЭХ и/или анализа коагулирующей активности FIX относительно срока хранения лиофилизированного порошка, приготовленного с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0158]** В изобретении также предложен способ уменьшения времени восстановления лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем время восстановления лиофилизированного порошка уменьшено относительно времени восстановления лиофилизированного порошка, приготовленного с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0159]** В изобретении дополнительно предложен способ уменьшения продолжительности процесса лиофилизации при получении лиофилизированного порошка, содержащего полипептид FIX, включающий лиофилизацию прелиофилизационного состава согласно способам, описанным в данном документе, причем продолжительность процесса лиофилизации прелиофилизационного состава уменьшена относительно продолжительности процесса лиофилизации при получении лиофилизированного порошка с использованием способа лиофилизации, включающего более одной стадии сушки.

**[0160]** После подробного описания настоящего изобретения, то же самое будет более четко понято на основе следующих примеров, которые при этом включены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения данного изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в данном документе, явно включены в данный документ посредством ссылки.



## ПРИМЕРЫ

## Пример 1. Композиции лекарственного средства и лекарственного препарата, содержащих фактор IX-Fc

Описание rFIXFc

**[0161]** rFIXFc представляет собой полностью рекомбинантный гибридный белок длительного действия, состоящий из фактора свертывания IX (FIX), ковалентно присоединенного к домену Fc человеческого иммуноглобулина G1 (IgG1). Участок фактора IX в rFIXFc имеет первичную аминокислотную последовательность, идентичную аллельной форме полученного из плазмы фактора IX с треонином в положении 148, и имеет структурные и функциональные характеристики, подобные эндогенному фактору IX. Домен Fc в rFIXFc включает шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG1. rFIXFc содержит 869 аминокислот и имеет молекулярную массу приблизительно 98 килодальтон.

**[0162]** rFIXFc получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК в клеточной линии, полученной из эмбриональных почек человека (HEK), а затем очищали.

**[0163]** Состав лекарственного препарата rFIXFc по данному изобретению, содержащего rFIXFc, может дать возможность разработать высококонцентрированные лекарственные препараты, например, с дозировкой в лекарственном препарате 4000+ МЕ/флакон. Для этого необходима более высокая концентрация белка rFIXFc в лекарственном средстве, как показано в Таблице 1 ниже. Состав лекарственного препарата rFIXFc по данному изобретению позволяет увеличивать срок хранения лекарственного препарата с дозировками 250 и 500 МЕ/флакон и повышать стабильность при комнатной температуре. Данные, полученные при разработке, демонстрируют, что лекарственные препараты с дозировками 250 и 500 МЕ/флакон значительно более стабильные в условиях ускоренных испытаний, чем контрольный лекарственный препарат.

**[0164]** Состав лекарственного препарата rFIXFc по данному изобретению также позволяет снижать время восстановления после лиофилизации. Время восстановления контрольного лекарственного препарата изменяется в диапазоне 1-2 минут. Данные, полученные при разработке, демонстрируют, что лекарственный препарат LCM снижает время восстановления до менее чем 30 секунд.

**[0165]** Состав лекарственного препарата rFIXFc по данному изобретению также позволяет снижать продолжительность процесса лиофилизации. На данный момент цикл лиофилизации составляет ~4,5 дня. При меньшем номинальном объеме флакона его продолжительность возможно уменьшить до ~3 дней или менее для более экономически выгодного производства.

Лекарственное средство (ЛС)

**[0166]** В лекарственном средстве для препарата rFIXFc по данному изобретению будут использоваться те же самые вспомогательные вещества, что и в контрольном лекарственном средстве. Более высокие концентрации будут достигаться с использованием второй стадии ультрафильтрации при производстве лекарственного средства. См. Таблицу 1.

**Таблица 1. Композиции лекарственных средств**

<b>Композиции лекарственных средств</b>		
<b>Компонент</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат</b>	<b>Лекарственный препарат</b>
Рекомбинантный фактор IX-Fc	10-13 мг/мл	65-75 мг/мл
L-гистидин	3,88 мг/мл (25 мМ)	3,88 мг/мл (25 мМ)
Полисорбат 20	0,1 мг/мл (0,01 %)	0,1 мг/мл (0,1 %)

Лекарственный препарат (ЛП)

**[0167]** Для того, чтобы достичь вышеизложенных целей, лекарственный препарат разрабатывали так, чтобы он содержал удвоенные концентрации всех компонентов контрольного лекарственного препарата (белка и вспомогательных веществ), что достигалось уменьшением номинального объема флакона до лиофилизации. Это гарантирует сохранение доз всех компонентов для пациента, и в то же время улучшает рабочие параметры лекарственного препарата, указанные выше.

**[0168]** В Таблицах 2-4 ниже подробно описаны композиция исходной прелиофилизационной смеси, состав твердой массы во флаконе после лиофилизации и композиция после восстановления. Важно отметить широкий интервал концентраций белка rFIXFc. Вследствие того, что каждая партия фактора IX немного отличается по своей активности в МЕ/мг, исходную смесь составляют на основании измеренной активности. Это приводит к интервалу концентраций белка, и это отклонение, добавленное к различным дозировкам в лекарственном препарате, дает интервалы, указанные ниже.

**Таблица 2. Лекарственный препарат – композиции прелиофилизационных составов**

<b>Исходные композиции для лиофилизации для получения лекарственного препарата</b>			
<b>Компонент</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат</b>	<b>Лекарственный препарат</b>

	<b>250-2000 МЕ/флакон</b>	<b>3000 МЕ/флакон</b>	<b>250-5500 МЕ/флакон</b>
Рекомбинантный фактор IX-Fc	0,45-9,5 мг/мл 40-500 МЕ/мл	5,5-13,7 мг/мл 480-750 МЕ/мл	0,9-50 мг/мл 80-2750 МЕ/мл
L-гистидин	3,88 мг/мл (25 мМ)	3,88 мг/мл (25 мМ)	7,76 мг/мл (50 мМ)
Маннит	23,8 мг/мл (131 мМ)	23,8 мг/мл (131 мМ)	47,6 мг/мл (261 мМ)
Сахароза	11,9 мг/мл (35 мМ)	11,9 мг/мл (35 мМ)	23,8 мг/мл (70 мМ)
Полисорбат 20	0,1 мг/мл (0,01 %)	0,1 мг/мл (0,01 %)	0,2 мг/мл (0,2 %)
Номинальный объем для исходной смеси	5,3 мл	7,4 мл	2,65 мл

**Таблица 3. Лекарственный препарат – лиофилизированные композиции**  
**Композиции лиофилизированной твердой массы во флаконах для получения**  
**лекарственного препарата**

<b>Компонент</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат 250-2000 МЕ/флакон</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат 3000 МЕ/флакон</b>	<b>Лекарственный препарат 250-5500 МЕ/флакон*</b>
Рекомбинантный фактор IX-Fc	2,2-46 мг/флакон	28-69 мг/флакон	2,2-125 мг/флакон
L-гистидин	19,4 мг/флакон	27,2 мг/флакон	19,4 мг/флакон
Маннит	119 мг/флакон	167 мг/флакон	119 мг/флакон
Сахароза	59,5 мг/флакон	83,3 мг/флакон	59,5 мг/флакон
Полисорбат 20	0,5 мг/флакон	0,7 мг/флакон	0,5 мг/флакон

\*Значения представляют собой номинальные значения, которые не включают переполнение. Значения, включающие переполнение, равны: 20,6 мг/флакон (L-гистидин), 126,01 мг/флакон (маннит), 63,1 мг/флакон (сахароза) и 0,53 мг/флакон (полисорбат).

**Таблица 4. Лекарственный препарат – композиции восстановленных составов**  
**Композиции лекарственного препарата во флаконах после восстановления**

<b>Компонент</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат 250-2000 МЕ/флакон</b>	<b>Контрольный лекарственный препарат 3000 МЕ/флакон</b>	<b>Лекарственный препарат 250-5500 МЕ/флакон</b>
Растворитель	5,2 мл NaCl в воде для инъекций		
Рекомбинантный фактор IX-Fc	0,45-9,5 мг/мл 40-500 МЕ/мл	5,5-13,7 мг/мл 480-750 МЕ/мл	0,9-50,0 мг/мл 80-2750 МЕ/мл
L-гистидин	3,88 мг/мл (25 мМ)	5,43 мг/мл (35 мМ)	3,88 мг/мл (25 мМ)

Маннит	23,8 мг/мл (131 мМ)	33,3 мг/мл (183 мМ)	23,8 мг/мл (131 мМ)
Сахароза	11,9 мг/мл (35 мМ)	16,7 мг/мл (48 мМ)	11,9 мг/мл (35 мМ)
Полисорбат 20	0,1 мг/мл (0,01 %)	0,14 мг/мл (0,014 %)	0,1 мг/мл (0,01 %)
Восстанавливающий буферный раствор	3,25 мг/мл	3,25 мг/мл	3,25 мг/мл
Объем после восстановления	5,3 мл	5,3 мл	5,3 мл

## Пример 2. Разработка параметров лиофилизационного цикла для лекарственного препарата rFIXFc второго поколения

### Краткое изложение

**[0169]** Целью данного исследования являлось оценить интервалы параметров фазы сушки цикла лиофилизации для лекарственного препарата rFIXFc по данному изобретению.

**[0170]** Этот отчет обобщает статистическое моделирование эксперимента (МЭ) по оценке параметров процесса лиофилизации (температура полки при сушке, уровень вакуума в камере и время сушки) и их влиянию на температуру продукта при сушке, остаточное содержание влаги или скорость сушки лекарственного препарата.

**[0171]** Предварительное моделирование цикла лиофилизации для лекарственного препарата rFIXFc второго поколения продемонстрировало, что нет необходимости в отдельных стадиях первичной и вторичной сушки вследствие высокой температуры коллапса состава, равной приблизительно  $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Для оценки влияния температуры полок, степени вакуума и времени сушки на остаточное содержание влаги и температуру продукта в течение процесса лиофилизации плацебо было разработано 12 модельных экспериментов (МЭ). Анализ данных показал, что для того, чтобы остаточное содержание влаги составляло менее 1 %, в течение фазы сушки необходима минимальная температура полок, равная  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Анализ также продемонстрировал, что время сушки более 25 часов дополнительно не снижает остаточное содержание влаги во флаконах, а уровень вакуума в камере только незначительно влияет на остаточное содержание влаги. На температуру продукта в течение сушки значительно влияет температура полок и уровень вакуума в камере, но наиболее жесткие условия сушки в исследовании (температура полок  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и уровень вакуума, соответствующий давлению 1000 мторр) давали температуру продукта, которая была на более чем  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  ниже, чем температура коллапса. Массовый поток во флаконе преимущественно является функцией температуры полок, и для поддержания уровня вакуума, необходимо, чтобы промышленный лиофилизатор был способен выдерживать скорости потока влаги  $0,7\text{ г/ч/флакон}$ . Был предложен цикл лиофилизации, приводящий к

получению продукта с остаточным содержанием влаги  $< 0,5 \%$ , в котором температура полок составляет  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , степень вакуума в камере - 250 мторр (0,33 мбар), а температура сушки - 25 часов.

введение

**[0172]** Композиция лекарственного препарата второго поколения, содержащего фактор IX-Fc (rFIXFc-2G), была разработана так, чтобы увеличить стабильность белка в условиях ускоренных испытаний, уменьшить время восстановления и снизить номинальный объем для уменьшения разбрызгивания на пробку. Это выполняли уменьшением номинального объема с 5,3 мл до 2,65 мл и удвоением концентраций белка и вспомогательных веществ в составе, так что восстановленный препарат такой же, как и композиция первого поколения. Другим преимуществом уменьшения номинального объема являлось снижение количества воды, которое необходимо удалить в течение процесса лиофилизации.

**[0173]** Так как разработка нового лекарственного препарата требует повторной валидации процесса получения лекарственного препарата, цикл лиофилизации был разработан повторно. Измеренная температура коллапса плацебо-состава составляла приблизительно  $-1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , что позволило бы использовать более короткий цикл лиофилизации, чем тот, который был разработан для процесса лиофилизации контрольного препарата rFIXFc. В первоначальных экспериментах было определено, что нет необходимости в отдельной первичной стадии сушки, так как продукт не подвергается разрушению даже при температуре полок более  $40^\circ\text{C}$ . Цикл разрабатывали с использованием параметров замораживания для контрольного лекарственного препарата в сочетании с переходом непосредственно к температуре первичной сушки после наложения вакуума. Плацебо является хорошим заменителем для флаконов, содержащих rFIXFc-2G, так как маннит обеспечивает кристаллическую структуру массы, причем ее внешний вид такой же, как и во флаконах с активным ингредиентом. Аморфный сахар также более сложно высушить, чем белок, так что полученное остаточное содержание влаги немного выше, представляя наихудшее значение для процесса. Отсутствие белка во флаконах также уменьшает устойчивость к парам воды, давая наихудшую оценку для массовой скорости потока во флаконе.

**[0174]** Статистическое моделирование эксперимента было проведено, чтобы оценить параметры процесса лиофилизации (температура полки при сушке, уровень вакуума в камере и время сушки) и их влияние на температуру продукта при сушке, остаточное содержание влаги или скорость сушки лекарственного препарата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

[0175] Целью данного исследования являлось оценить интервалы параметров фазы сушки цикла лиофилизации для лекарственного препарата rFIXFc второго поколения. Параметры фазы сушки и интервалы, используемые для планирования МЭ с использованием программного обеспечения JMP 9, представлены в Таблице 5. Полученный план МЭ, состоящий из 12 экспериментов, который демонстрирует заданные значения параметров для отдельного испытания, показан в Таблице 6.

Таблица 5. Интервалы параметров сушки, используемые при планировании МЭ

Моделируемый параметр сушки	Минимальное значение	Максимальное значение
Температура полки (°C)	0	40
Вакуум в камере (мторр)	100	1000
Время сушки (ч)	15	35

Таблица 6. План исследования на основании результатов шаблонных вычислений в JMP 9

Испытание	Температура (°C)	Вакуум (мторр)	Время (ч)
1	40	100	35
2	0	100	15
3	40	1000	25
4	20	100	28,2
5	20	500	25
6	0	100	25
7	20	550	25
8	40	250	15
9	20	1000	15
10	0	1000	35
11	10	500	25
12	40	500	25

[0176] Для каждого цикла лиофилизации в исследовании восемьдесят флаконов компании Schott вместимостью 10 мл (номер по каталогу 68000320) заполняли 2,75 мл плацебо для rFIXFc второго поколения, как показано в Таблице 7, что является наилучшим номинальным объемом для оценки содержания влаги. Для каждого эксперимента заполненные флаконы располагали на одной полке с тремя термопарами, как показано на фиг. 1.

Таблица 7. Рецепт плацебо для лекарственного препарата rFIXFc второго поколения

Компонент	FW	г/л	мМ	% (масса/объем)
-----------	----	-----	----	-----------------

Гистидин	155,15	7,76	50,00	0,776
ПС-20	1227,54	0,2	0,1629	0,020
Маннит	182,172	47,6	261,29	4,760
Сахароза	342,30	23,8	69,53	2,380
	$\rho =$	1,029	г/мл	

[0177] Использованные циклы лиофилизации являлись видоизменениями цикла, показанного в Таблице 8. Температуру полок лиофилизатора при сушке, продолжительность стадии сушки и уровень вакуума при сушке варьировали на основании плана экспериментов, показанного в Таблице 6. Для каждого цикла лиофилизации использовали Lyostar II (SP Industries), а флаконы помещали на среднюю полку.

**Таблица 8. Параметры цикла лиофилизации, демонстрирующие входные температуру, время и вакуум при МЭ**

Фаза	Стадия	Темп. (°C)	Скорость (°C/мин)	Смачивание (мин.)	Вакуум (мторр)
Загрузка	Загрузка	25	-	по необходимости	-
Замораживание	Уравновешивание	0	0,5	60	-
	Замораживание	-55	0,5	120	-
	Отжиг	-6	0,5	180	-
	Замораживание	-55	0,5	120	-
Понижение давления	Первоначальное наложение вакуума	-55	-	-	моделируемое давление
Сушка	1°/2° сушка	моделируемая температура	не изменяется	моделируемое время	моделируемое давление
Заключительная	Заключительная	5	5,0	по необходимости	моделируемое давление

[0178] Для каждого цикла лиофилизации из углов и середины выбирали пять флаконов, в которых определяли остаточное содержание влаги с использованием процедуры TDMP-74 и усредняли для всей полки. Измеряли температуру продукта во время стадии сушки и массовую скорость потока во флаконе с использованием термопар и путем манометрического измерения температуры с помощью программного обеспечения Lyostar II. Эти результаты анализировали с использованием программного обеспечения JMP 9 для оценки влияния параметров сушки на процесс лиофилизации rFIXFc второго поколения. Для определения значимых переменных выполняли постадийный анализ JMP, и эти переменные затем анализировали с использованием стандартного алгоритма определения влияния с использованием метода наименьших квадратов, который показывает как

выходные данные для процесса (остаточное содержание влаги, температура продукта и массовый поток в течение сушки) реагируют на входные переменные.

Результаты и их обсуждение

[0179] Результаты двенадцати экспериментов по исследованию лиофилизации показаны в Таблице 9.

**Таблица 9. Результаты МЭ для остаточного содержания влаги, массового потока во флаконе и температуры продукта**

Испытание	Темп. (°С)	Вакуум (мторр)	Время (ч)	Ссылка NB	Влажность (%)	dm/dt (г/ч/флакон)	T <sub>продукта</sub> (МТМ, °С)
1	40	100	35	16322-117	0,33	0,53	-26,5
2	0	100	15	16322-110	2,82	0,28	-32,2
3	40	1000	25	16322-090	0,57	0,45	-15,2
4	20	100	28,2	16322-139	1,28	0,41	-29,5
5	20	500	25	16322-098	1,58	0,57	-20,3
6	0	100	25	16322-151	2,18	0,27	-32,5
7	20	550	25	16322-146	1,49	0,56	-19,7
8	40	250	15	18266-004	0,59	0,70	-21,9
9	20	1000	15	16322-131	1,95	0,38	-15,6
10	0	1000	35	16322-124	2,56	0,17	-15,8
11	10	500	25	16322-104	2,01	0,35	-21,8
12	40	500	25	16322-083	0,49	0,56	-19,8

### 1. Влияние параметров цикла лиофилизации на остаточное содержание влаги

[0180] Плацебо для гFIXFc-2G использовали как замену лекарственного препарата с наихудшими характеристиками, так как обычно более сложно удалить остаточную влагу из сахаров во время стадии вторичной сушки, чем из белка. Итоговая предсказанная кривая зависимости, демонстрирующая результаты анализа при МЭ, показана на фиг. 2. Очевидными являются несколько результатов наблюдений. Температура полки оказывает наиболее значительное влияние на остаточное содержание влаги в лекарственном препарате. Это ожидаемо на основании того факта, что вторичная сушка, при которой удаляется прочно связанная вода, представляет собой процесс, контролируемый диффузией и десорбцией. Модель с высокой достоверностью предсказывает, что для достижения уровня остаточной влажности менее 1 %, необходима температура полки выше 30 °С. Степень вакуума, по-видимому, имеет малое, но измеримое влияние на итоговое остаточное содержание влаги. Время сушки, по-видимому, имеет точку уменьшения влияния, наблюдающуюся через 25 часов, когда дополнительное увеличение времени сушки не



приводит к дальнейшему уменьшению остаточного содержания влаги. Этот тип поведения согласуется с кинетическим подходом к равновесным границам, определяемым температурой полки, а содержание влаги асимптотически приближается к определенной величине, когда дополнительная сушка невозможна. На основании этого анализа остаточного содержания влаги при МЭ температура полки при сушке должна составлять 30 °С или выше, а время сушки должно быть равным 25 часов или менее.

## ***2. Влияние параметров цикла лиофилизации на температуру продукта при сублимации***

**[0181]** Измеренная температура разрушения при сублимационной сушке плацебо для лекарственного препарата rFIXFc-2G составляла приблизительно -1,5 °С. С практической точки зрения это означает, что структура массы лекарственного препарата будет сохраняться при условии, что температура продукта поддерживается ниже этой температуры коллапса по мере того, как объемная вода удаляется из флакона при лиофилизации. С помощью МЭ было определено, что как температура полки, так и степень вакуума в камере в значительной степени влияют на температуру продукта, как показано на фиг. 3. Наибольшее влияние оказывает степень вакуума в камере, причем более высокие значения давления приводят к более высоким температурам продукта при сублимации. Даже при 1000 мторр (1,33 мбар) наиболее высокая измеренная температура продукта составляла -15,2 °С, приблизительно на 13 °С ниже, чем температура коллапса продукта. Температура полок также оказывает некоторое влияние на температуру продукта, но это влияние менее отчетливо выражено, чем влияние вакуума. Анализ демонстрирует, что риск коллапса небольшой даже при температуре полок 40 °С и степени вакуума в камере 1000 мторр, что практически устраняет возможность коллапса при использовании любых практически осуществимых параметров цикла лиофилизации.

## ***3. Влияние параметров цикла лиофилизации на массовую скорость потока во флаконе при сублимации***

**[0182]** Массовая скорость потока во флаконе ( $dm/dt$ ) является мерой скорости, с которой вода удаляется из флаконов в течение процесса сублимации. Когда для уменьшения времени, затраченного на цикл лиофилизации, желательна более быстрая сушка, слишком много влаги может попасть на конденсаторы промышленных лиофилизаторов и привести к потере вакуума в камере с продуктом. Плацебо представляет наихудший случай массового потока во флаконе. Так как в составе не присутствует белок, доли твердых веществ в массе после лиофилизации минимизированы, и это приводит к более низкой устойчивости массовому потоку из лиофилизированной массы. Температура

полок оказывает значительное влияние на массовый поток во флаконе, как показано на фиг. 4, причем увеличение температуры приводит к более быстрой сублимации. Степень вакуума в камере включена в модель при МЭ, но значение  $p$  составляет 0,136, которое не является значимым с вероятностью 95 %. Наивысшее измеренное  $dm/dt$  в исследовании составляло 0,7 г/ч/флакон.

#### 4. Цикл лиофилизации rFIXFc второго поколения, предлагаемый на основании МЭ исследования плацебо

[0183] Данные МЭ исследования плацебо свидетельствуют о том, что возможно разработать цикл лиофилизации так, чтобы получить целевое остаточное содержание влаги < 0,5 %, при этом поддерживая температуру продукта ниже температуры коллапса, с использованием одной стадии сушки. Предлагаемый цикл лиофилизации показан в Таблице 10, а данные из испытания 8 МЭ, условия которого аналогичны предлагаемому циклу лиофилизации rFIXFc-2G, показаны на фиг. 5. Целевое содержание влаги было выбрано равным 0,5 %, так как это среднее значение для серии лекарственных препаратов rFIXFc первого поколения. Такое содержание влаги выбрано с запасом, следовательно, хотя продукт абсорбирует влагу в условиях ускоренных испытаний стабильности, характеристики качества продукта не будут затронуты.

[0184] Использовали стадии замораживания и отжига цикла лиофилизации, разработанные для цикла лиофилизации контрольного лекарственного препарата rFIXFc, а отдельные стадии первичной и вторичной сушки заменяли одной стадией сушки при температуре полки 40 °С и вакууме, соответствующем давлению 250 мторр, в течение 25 часов.

Таблица 10. Предлагаемый цикл лиофилизации для rFIXFc-2G

Фаза	Стадия	Темп. (°С)	Скорость (°С/мин)	Смачивание (мин.)	Вакуум (мторр)
Загрузка	Загрузка	25	-	по необходимости	-
Замораживание	Уравновешивание	0	0,5	60	-
	Замораживание	-55	0,5	120	-
	Отжиг	-6	0,5	180	-
	Замораживание	-55	0,5	120	-
Понижение давления	Первоначальное наложение вакуума	-55	-	-	250
Сушка	1°/2° сушка	40	0,5	1500	250
Заключительная	Заключительная	5	5,0	по необходимости	250

## Заключение

**[0185]** Было выполнено состоящее из 12 экспериментов моделирование, оценивающее влияние параметров процесса лиофилизации лекарственного препарата rFIXFc второго поколения на остаточное содержание влаги, температуру продукта и массовую скорость потока во флаконе при использовании плацебо. Анализ данных показал, что для того, чтобы остаточное содержание влаги составляло менее 1 %, в течение фазы сушки необходима минимальная температура полок, равная 30 °С. Анализ также продемонстрировал, что время сушки более 25 часов не снижает значительно остаточное содержание влаги во флаконах, а степень вакуума только незначительно влияет на остаточное содержание влаги. На температуру продукта в течение сушки значительно влияет температура полок и степень вакуума в камере. Наиболее жесткие условия в исследовании (температура полок 40 °С и вакуум, соответствующий давлению 1000 мторр) давали температуру продукта, которая была на более чем 10 °С ниже, чем температура коллапса.

**[0186]** Был предложен цикл лиофилизации, приводящий к получению продукта с остаточным содержанием влаги < 0,5 %, в котором температура полок составляет 40°С, степень вакуума в камере - 250 мторр (0,33 мбар), а температура сушки - 25 часов.

**[0187]** Предшествующее описание конкретных вариантов реализации изобретения настолько полно раскрывает общий характер изобретения, что другие могут, применяя знания в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты реализации изобретения, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно предполагается что, такие адаптации и модификации находятся в пределах содержания и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов реализации изобретения, основанных на идеях и рекомендациях, представленных в данном документе. Следует иметь в виду, что формулировки или терминология используется в данном документе в целях описания, а не ограничения, таким образом, терминология или формулировки настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в данной области техники с учетом представленных идей и рекомендаций.

**[0188]** Объем и границы настоящего изобретения не следует ограничивать любым из представленных выше иллюстративных вариантов реализации изобретения, они должны определяться только в соответствии с нижеследующей формулой изобретения и ее эквивалентами. Другие варианты реализации изобретения понятны специалистам в данной

области из рассмотрения данного описания и практического осуществления изобретения, описанного в данном документе.

**[0189]** Все документы, статьи, публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент были указаны конкретно и отдельно как включенные посредством ссылки.

**[0190]** В настоящей заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/969801, поданной 24 марта 2014 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**Таблица 11. Полинуклеотидные последовательности FIX**

Последовательность цепи ДНК FIX-Fc (сигнальный пептид FIX подчеркнут, последовательность FIX дважды подчеркнута, фрагмент Fc набран жирным шрифтом) (SEQ ID №:1, которая кодирует SEQ ID №:2)

Нуклеотидная последовательность pSYN-FIX-030 (нуклеотиды 1 - 7583) :

Экзон 1 FIX (сигнальный пептид, пропептид с первой аминокислоты) : нуклеотиды 690-777

Мини-интрон FIX: нуклеотиды 778-1076

Последовательность FIX: нуклеотиды 1077-2371

Fc: нуклеотиды 2372-3052

```

1 gcgcgcggtg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg
51 gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcggtta cataacttac
101 ggtaaattggc ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt
151 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga
201 cgtcaatggg tggagtatth acggtaaact gccacttgg cagtacatca
251 agtgtatcat atgccaagta cccccctat tgacgtcaat gacggtaaат
301 gggccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact
351 tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgtc attaccatgg tgatgcggtt
401 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
451 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacccaaат
501 caacgggact ttccaaaатg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat
551 gggcggtagg cgtgtacggt gggaggтcта tataagcaga gctctctggc
601 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaаттаa tacgactcac
651 tatagggaga cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgacgcgct
701 gaacatgatc atggcagaат caccaggcct catcaccatc tgcccttttag
751 gatatctact cagtgctgaa tgtacagggt tgtttccttt tttaaаатac
801 attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg ctgtcttctt

```

851 cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag  
901 ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggctcc  
951 atgccctaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga  
1001 ctttcttaag agatgtaaaa ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac  
1051 taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaacgcca  
1101 acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag  
1151 tttgttcaag ggaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agtqtagttt  
1201 tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt  
1251 ggaagcagta tgttgatgga gatcagtggtg agtccaatcc atgtttaaat  
1301 ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatggt ggtgtccctt  
1351 tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt aacattaaga  
1401 atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt  
1451 tgctcctgta ctgagggata tgcacttgca gaaaaccaga agtcctgtga  
1501 accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta  
1551 agctcaccg tgctgagact gtttttctg atgtggacta tgtaattct  
1601 actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaagca cccaatcatt  
1651 taatgacttc actcgggttg ttggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat  
1701 tcccttgga ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc  
1751 tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaac  
1801 tgggtgttaa attacagttg tgcaggtga acataatatt gaggagacag  
1851 aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac  
1901 tacaatgcag ctattaataa gtacaacat gacattgccc ttctggaact  
1951 ggacgaacct ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg  
2001 acaaggaata cacgaacatc ttctcaaatt ttggatctgg ctatgtaagt  
2051 ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta  
2101 ccttagagtt ccacttggtg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt  
2151 tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga  
2201 gattcatgtc aaggagatag tgggggacct catgttactg aagtggaag  
2251 gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggaagag tgtgcaatga  
2301 aaggcaaata tggaatatat accaaggtgt cccggtatgt caactggatt  
2351 aaggaaaaaa caaagctcac **tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc**  
2401 **agctcggaa ctctggggg gacogtcaagt ctctctctt ccccaaaaac**

2451 ccaaggacac cctcatgata tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg  
2501 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga  
2551 cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca  
2601 acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg  
2651 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc  
2701 ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac  
2751 aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc  
2801 agcctgacct gcctgggtcaa aggetttctat cccagcgcaca tcgccgtgga  
2851 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg  
2901 tgttggtactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac  
2951 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctcog tgatgcatga  
3001 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta  
3051 aatgagaatt cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac  
3101 aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta  
3151 ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt tggggtgggc  
3201 gaagaactcc agcatgagat ccccgctctg gaggatcctc cagccggcgt  
3251 cccgaaaaac gattccgaag cccaaccttt catagaaggc ggcggtgaa  
3301 tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtctctg tctcggcca cgaagtgcac  
3351 gcagttgccg gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcctc cacggtgct  
3401 cgccgatctc ggtcatggcc ggcccggagg cgtcccggaa gttcgtggac  
3451 acgacctccg accactcggc gtacagctcg tccaggccgc gcaccacac  
3501 ccaggccagg gtgttgctccg gcaccacctg gtcttgacc gcgctgatga  
3551 acagggtcac gtcgtcccgg accacaccgg cgaagtctc ctccacgaag  
3601 tcccgggaga acccgagccg gtcgggtccag aactcgaccg ctccggcgac  
3651 gtcgcgcgcg gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggttt  
3701 agttcctcac cttgtcgtat tatactatgc cgatatacta tgccgatgat  
3751 taattgtcaa cacgtgctga tcagatccga aaatggatat acaagctccc  
3801 gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctcaacttt  
3851 ctggaatagc tcagaggcag agggcgctc gccctctgca taaataaaaa  
3901 aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaaactggg cggagttagg  
3951 ggcgggatgg gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag  
4001 atgcatgctt tgcatacttc tgctgctgg ggagcctggg gactttccac

4051 acctggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct  
4101 ggggagcctg gggactttcc acaccctcgt cgagctagct tcgtgaggct  
4151 ccggtgcccg tcagtgggca gagcgcacat cccccacagt ccccgagaag  
4201 ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg  
4251 ggtaaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg  
4301 gtggggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt  
4351 cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg  
4401 cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt  
4451 ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggcg  
4501 ggccttgccg tttaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg  
4551 cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg  
4601 tctcgtgct ttcgataagt ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg  
4651 ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaggat  
4701 ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gcgggcggcg acggggcccg  
4751 tgcgtcccag cgcacatggt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac  
4801 cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct  
4851 ggcctcgcgc cgcctgtgat cgccccgcc tgggcggcaa ggctggcccg  
4901 gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc  
4951 cagggggctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag  
5001 tcaccacac aaaggaaagg ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcatg  
5051 tgactccacg gagtaccggg cgcctccag gcacctgat tagttctgga  
5101 gcttttgag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg  
5151 gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgcca  
5201 cttgatgtaa ttctccttg aatttgcct ttttgagttt ggatcttgg  
5251 tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gttttttct tccatttcag  
5301 gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgcc gccaccatgg agacagacac  
5351 actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca  
5401 aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg  
5451 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg  
5501 gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg  
5551 aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag  
5601 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt



5651 cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca  
5701 aggtctccaa caaagccctc ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa  
5751 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg  
5801 cgatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct  
5851 tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag  
5901 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg gctccttctt  
5951 cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg  
6001 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag  
6051 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataga ctcgagagat ctggccggct  
6101 gggcccgttt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggctctgat  
6151 tctacgcgta ccggatcatca tcaccatcac cattgagttt aaaccgcgtg  
6201 atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgcccct  
6251 cccccgtgcc ttccttgacc ctggaagggtg ccactcccac tgtcctttcc  
6301 taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcatctat  
6351 tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca  
6401 atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa  
6451 agaaccagtg gcggtaatc ggttatccac agaatacagg gataacgcag  
6501 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag  
6551 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca  
6601 caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa  
6651 gataccaggc gtttccccct agaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg  
6701 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt  
6751 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg  
6801 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc  
6851 tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga  
6901 cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt  
6951 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac  
7001 actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt  
7051 cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta  
7101 gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga  
7151 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa  
7201 cgaaaactca cgtaaagga ttttggatcat gacattaacc tataaaaata

7251 ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa  
 7301 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc  
 7351 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgggc  
 7401 ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga  
 7451 gtgcaccata tatgcgggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa  
 7501 taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg  
 7551 gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg cca

**Таблица 12. Последовательность полипептида FIX**

*Гибридный мономерный FIX-Fc: получен совместной экспрессией цепей FIX-Fc и Fc.*

А. цепь FIX-Fc (SEQ ID №: 2)

С-концевой лизин не присутствует ни в какой из субъединиц; этот процессинг часто наблюдается в рекомбинантных белках, полученных в культуре клеток млекопитающих, а также в белках, полученных из плазмы.

Субъединица FIX-Fc-SC (участок Fc в FIX-Fc набран жирным шрифтом):

1 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ  
 51 CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPPGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK  
 101 NSADNKVVCS STEGYRLAEN QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF  
 151 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG  
 201 KVDAFCGGSI VNEKWIIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV  
 251 IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNI FL  
 301 KFGSGYVSGW GRVFKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNMFC  
 351 AGFHEGGRDS CQGDSSGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK  
 401 VSRYVNWIKE KTKLTDKTHT **CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR**  
 451 **TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV**  
 501 **LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR**  
 551 **DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDGSEF**  
 601 **LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK**

### Таблица 13. Полинуклеотидные последовательности Fc

Последовательность ДНК Fc (сигнальный пептид Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID №:3, которая кодирует SEQ ID №:4)

1 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg  
 51 ttccactggg gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac  
 101 tcctgggagg accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc  
 151 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag  
 201 ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg  
 251 tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 301 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa  
 351 ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga  
 401 aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc  
 451 ctgcccccat cccgcatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg  
 501 cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca  
 551 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc  
 601 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg  
 651 gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca  
 701 accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

### Таблица 14. Последовательность полипептида Fc

цепь Fc (SEQ ID №:4)

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

## ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Прелиофилизационный состав, содержащий:
  - (a) полипептид фактор IX (FIX) в концентрации от около 80 МЕ/мл до около 2750 МЕ/мл, причем полипептид FIX представляет собой FIX, слитый с участком Fc;
  - (b) L-гистидин в концентрации от около 3 мг/мл до около 15 мг/мл;
  - (c) сахарозу в концентрации от около 10 мг/мл до около 50 мг/мл;
  - (d) маннит в концентрации от около 20 мг/мл до около 100 мг/мл; и
  - (e) полисорбат 20 в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 5 мг/мл,причем номинальный объем состава составляет менее 4 мл; а каждый из (a) - (e) присутствует в количестве на флакон (мг/флакон), достаточном для обеспечения
  - (1) повышения стабильности полипептида FIX после лиофилизации состава;
  - (2) уменьшения разбрызгивания на пробку флакона после лиофилизации состава;
  - (3) уменьшения времени цикла лиофилизации;
  - (4) увеличения срок хранения лиофилизата, полученного из прелиофилизационного состава, при комнатной температуре; или
  - (5) любых их комбинаций,по сравнению с контрольным прелиофилизационным составом, причем контрольный состав содержит (a) - (e) в количестве на флакон, идентичном данному прелиофилизационному составу, но номинальный имеет объем составляет 5 мл.
2. Прелиофилизационный состав по п. 1, отличающийся тем, что L-гистидин присутствует в концентрации около 7,76 мг/мл; сахароза присутствует в концентрации около 23,8 мг/мл; маннит присутствует в концентрации около 47,6 мг/мл; или полисорбат 20 присутствует в концентрации около 0,2 мг/мл.
3. Прелиофилизационный состав по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что номинальный объем состава на флакон составляет около 2,65 мл.
4. Лиофилизированный порошок, который получен лиофилизацией прелиофилизационного состава по любому из пп. 1-3.
5. Восстановленный состав, содержащий лиофилизированный порошок по п. 4, восстановленный с помощью восстанавливающего буферного раствора.
6. Флакон, содержащий лиофилизированный порошок по п. 4.

7. Набор, включающий первый контейнер, содержащий лиофилизированный порошок по п. 4, и второй контейнер, содержащий восстанавливающий буферный раствор в объеме, достаточном для получения восстановленного состава, при объединении с лиофилизационным составом из первого контейнера.

8. Применение восстановленного состава по п. 5 для предупреждения или уменьшения частоты или тяжести приступов кровотечения у пациента с гемофилией В.

9. Способ лиофилизации прелиофилизационного состава по п. 1, включающий:

(a) «стадию замораживания», включающую замораживание прелиофилизационного состава, имеющего номинальный объем менее 3 мл и содержащего полипептид FIX и водный растворитель, до температуры замораживания, составляющей от около  $-65^{\circ}\text{C}$  до около  $-40^{\circ}\text{C}$ ;

(b) «стадию вакуумирования», включающую снижение давления в камере с замороженным прелиофилизационным составом на величину, достаточную для удаления водного растворителя из замороженного прелиофилизационного состава; и

(c) единственную «стадию сушки», включающую повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава выше температуры коллапса, составляющей около  $-1,5^{\circ}\text{C}$ ,

что приводит к получению лиофилизированного порошка.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что:

(i) во время стадии замораживания температуру прелиофилизационного состава понижают от около  $5^{\circ}\text{C}$  до около  $-55^{\circ}\text{C}$  и причем во время стадии замораживания температуру замораживания поддерживают на протяжении от около 30 минут до около 5 часов;

(ii) замороженный прелиофилизационный состав, полученный на стадии (a), дополнительно обрабатывают на «стадии отжига» (a') перед началом «стадии вакуумирования» (b), причем во время стадии отжига температуру замороженного прелиофилизационного состава, полученного на стадии (a), повышают до температуры отжига, составляющей от около  $-15^{\circ}\text{C}$  до около  $-2^{\circ}\text{C}$ , и причем во время стадии отжига температуру отжига поддерживают на протяжении от около 30 минут до около 5 часов;

(iii) во время стадии отжига температуру замороженного прелиофилизационного состава понижают от температуры отжига до температуры, которая составляет от около  $-65^{\circ}\text{C}$  до около  $-40^{\circ}\text{C}$ ;

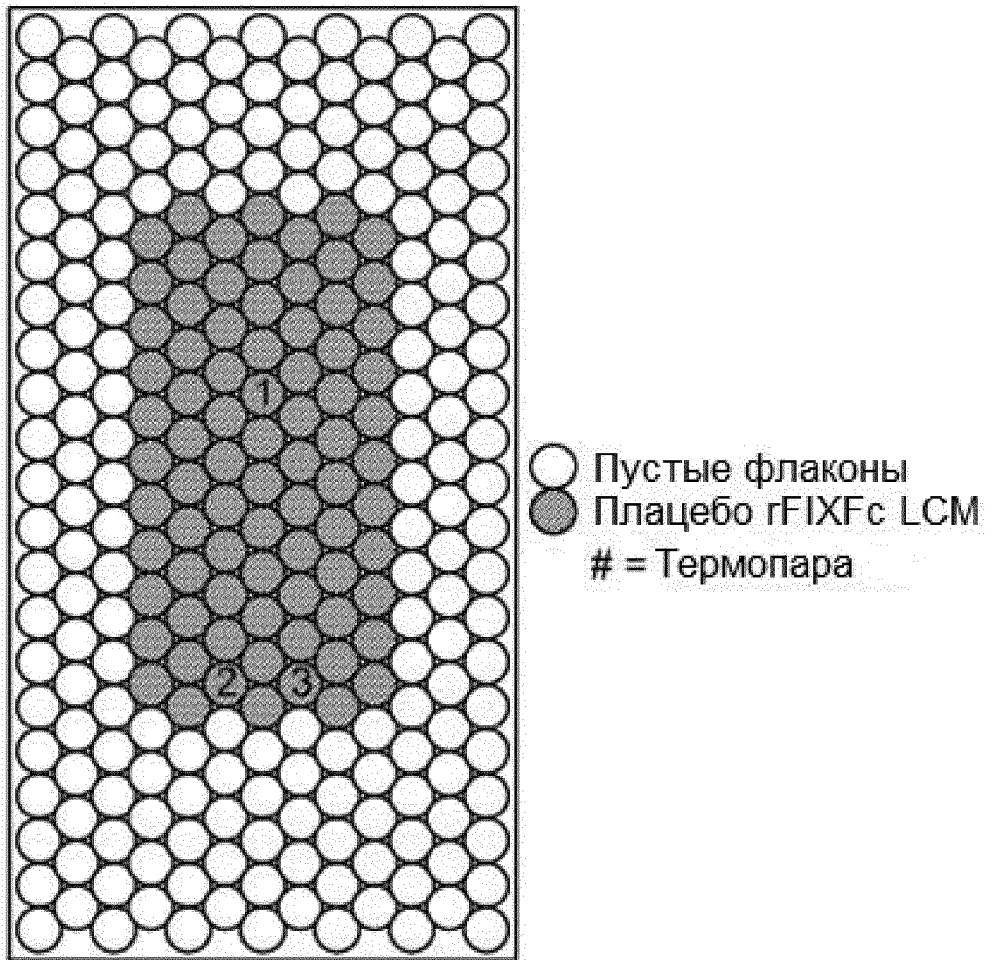
(iv) на «стадии вакуумирования» замороженный прелиофилизационный состав на протяжении около 2 часов подвергается воздействию вакуума, соответствующего давлению от около 0,05 до около 1 мбар; или

(v) «стадия сушки» включает повышение температуры замороженного прелиофилизационного состава от около  $-55^{\circ}\text{C}$  до температуры сушки, составляющей около  $40^{\circ}\text{C}$ , причем температуру сушки поддерживают на протяжении от около 10 часов до около 40 часов и причем стадию сушки проводят при давлении от около 0,05 мбар до около 1 мбар.

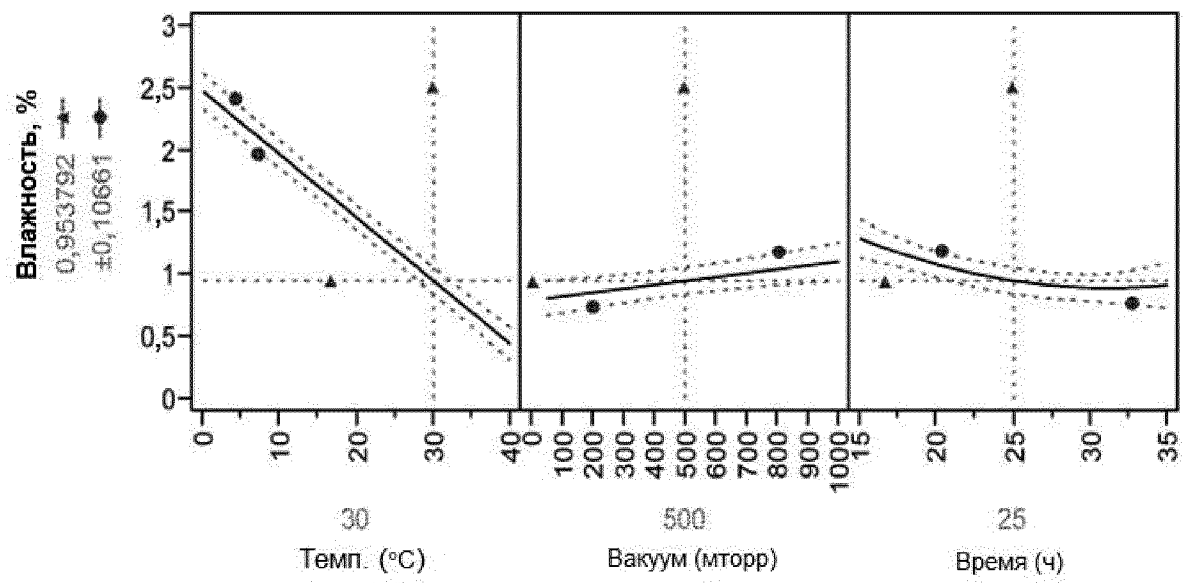
11. Способ по п. 9 или п. 10, отличающийся тем, что прелиофилизационный состав фильтруют в стерильных условиях и заливают во флакон в стерильных условиях до стадии (а), причем лиофилизированный порошок получают из прелиофилизационного состава в течение около 45 часов или менее, или остаточное содержание влаги в лиофилизированном порошке составляет менее 0,7 %.

12. Прелиофилизационный состав по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что полипептид FIX содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 1-642 последовательности SEQ ID №: 2.

13. Прелифилизационный состав по любому из пп. 1-3 и п. 12, отличающийся тем, что полипептид FIX представляет собой гетеродимерный белок с одной цепью FIXFc (FIXFc-sc) и одной цепью Fc (Fc-sc), которые связаны вместе посредством двух дисульфидных связей в шарнирной области Fc, причем FIXFc-sc имеет аминокислотную последовательность SEQ ID №: 2 без С-концевого лизина, а Fc-sc имеет аминокислотную последовательность SEQ ID №: 4 без С-концевого лизина.

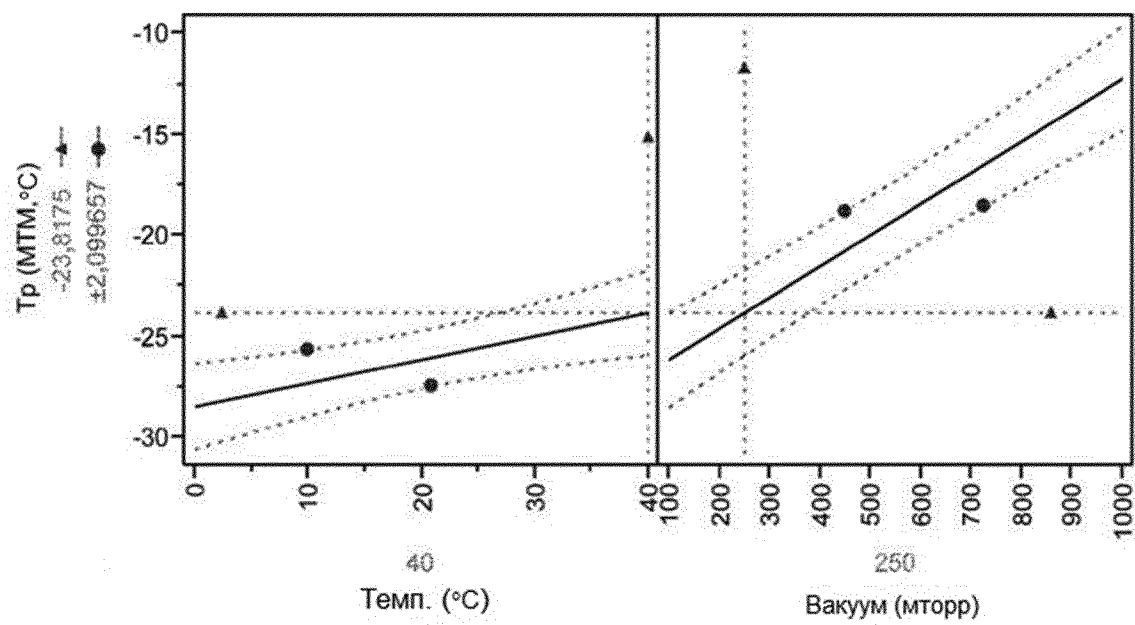


Фиг. 1

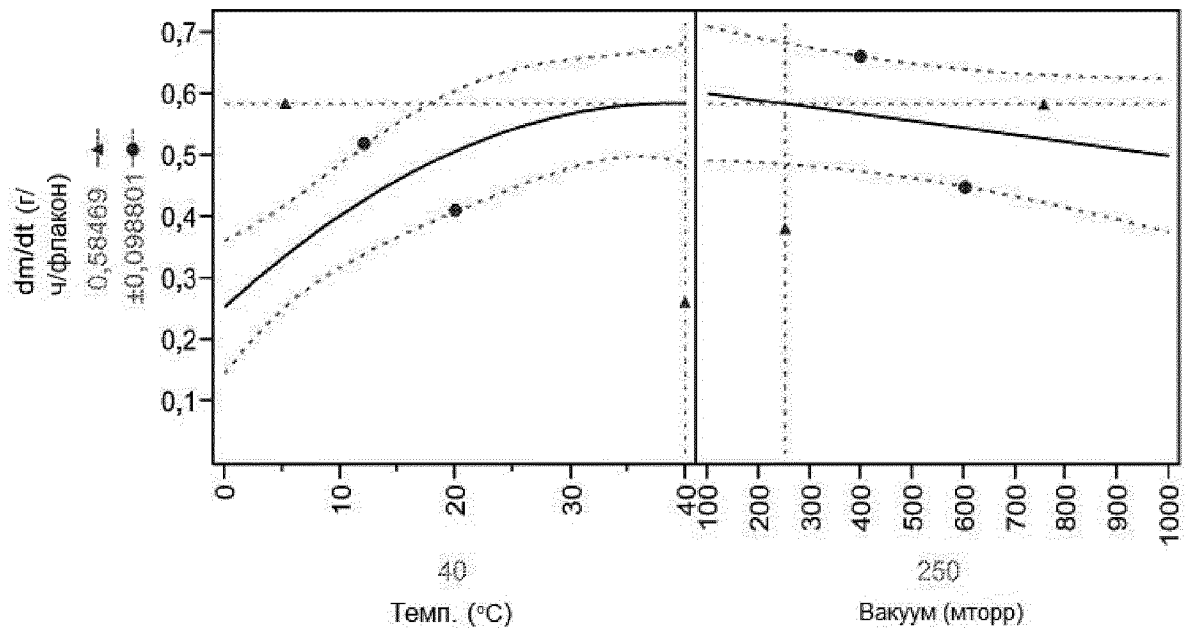


Фиг. 2

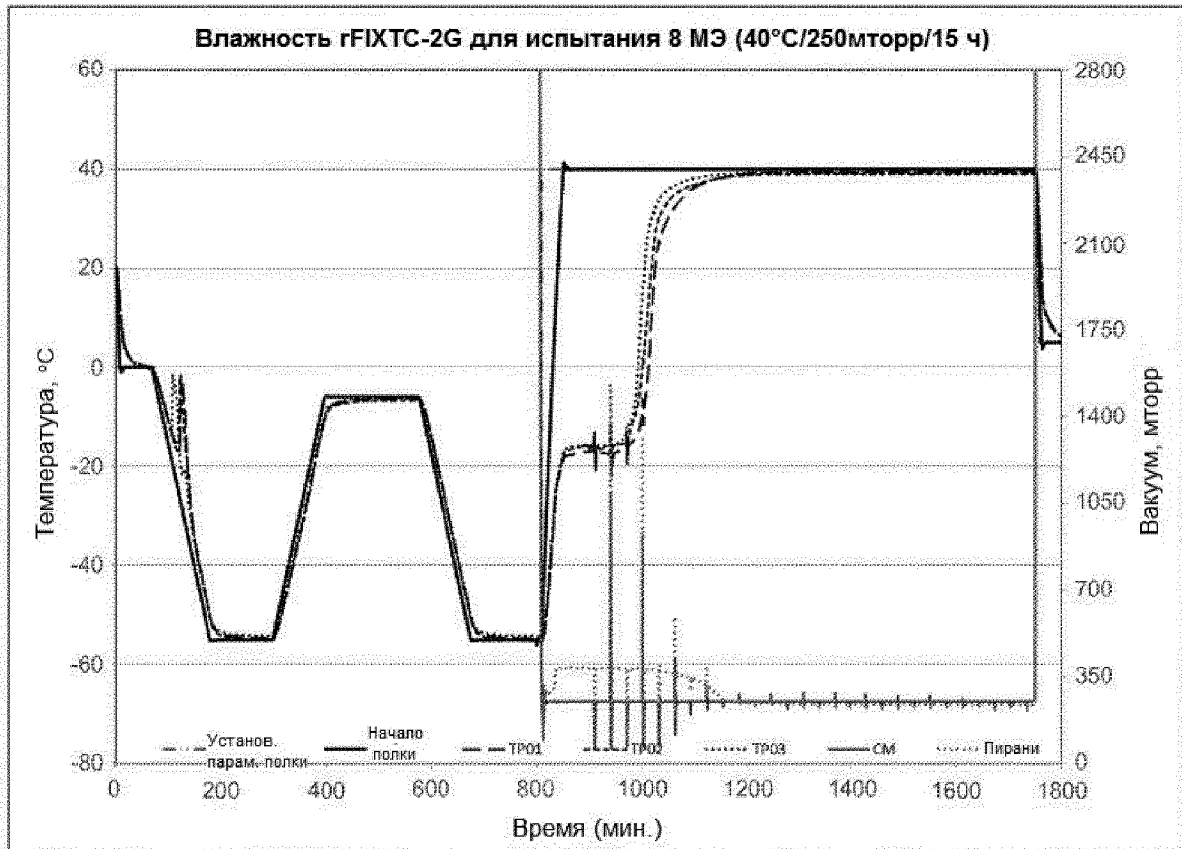




Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5