



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115120** (13) **C2**
(51) МПК

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

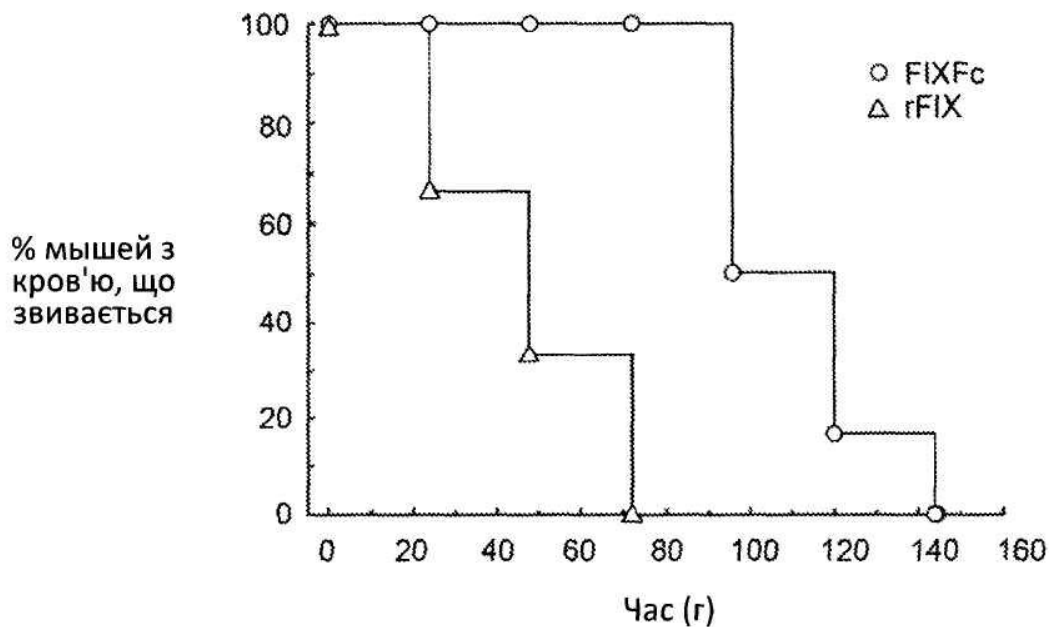
(21) Номер заявки:	а 2013 01039	(72) Винахідник(и): Пірс Гленн (US), Трукс Саманта (US), Пітерс Роберт Т. (US), Джіанг Хайянь (US)
(22) Дата подання заявки:	11.07.2011	(73) Власник(и): БАЙОДЖЕН ХЕМОФІЛІА ІНК., 250 Binney Street, Cambridge, MA 02142, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.09.2017	(74) Представник: Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/424,555, 61/470,951, 61/438,572, 61/363,064, 61/430,819, 61/442,079	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: PETERS ET AL.: 'Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein' THROMBOSIS AND HEMOSTASIS vol. 115, no. 10, March 2010, pages 2057 – 2064 SCHELLENBERGER ET AL.: 'A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner' NATURE BIOTECHNOLOGY vol. 27, no. 12, 2009, pages 1186 - 1190 WO 2009/130602 A2, 29.10.2009 HUANG ET AL: "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 20, no. 6, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 692-699 SHAPIRO A.D. ET AL, "SAFETY AND PROLONGED BIOLOGICAL ACTIVITY FOLLOWING A SINGLE ADMINISTRATION OF A RECOMBINANT MOLECULAR FUSION OF NATIVE HUMAN COAGULATION FACTOR IX AND THE FC REGION OF IMMUNOGLOBULIN G (IGG) (RFIXFC) TO SUBJECTS WITH HEMOPHILIA B", HAEMOPHILIA, (20100617), vol. 16, no. SUPPL. 4, PAGE 30
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	17.12.2010, 01.04.2011, 01.02.2011, 09.07.2010, 07.01.2011, 11.02.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US, US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку:	13.05.2013, Бюл.№ 9	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2017, Бюл.№ 18	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2011/043569, 11.07.2011	

(54) СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ ХИМЕРНОГО ПОЛІПЕПТИДУ ФАКТОРА ІХ

(57) Реферат:

UA 115120 C2

Винахід стосується способу контролю або запобігання випадків кровотечі у суб'єкта-людини, що цього потребує, який передбачає введення суб'єкту химерного поліпептиду Фактора IX (FIX), що включає FIX і FcRn зв'язувальний партнер (FcRn BP), у дозі від 50 до 180 МО/кг з інтервалом дозування від 9 до 18 днів, у якому зазначений FcRn BP включає Fc або альбумін, і у якому концентрація в плазмі крові химерного поліпептиду FIX досягає мінімального рівня щонайменше 1 МО/дл через 6 днів у згаданого пацієнта.



Фіг. 13

Рівень техніки

Галузь винаходу

[01] Даний винахід відноситься в цілому до галузі терапії захворювань гемостазу.

Рівень техніки

5 [02] Гемофілія В (також відома як хвороба Кристмаса) є однією з найпоширеніших наслідуваних хвороб крові у світі. Вона приводить до зниження *in vivo* і *in vitro* згортання крові й потребує постійного медичного спостереження протягом життя хворого. За відсутності втручання, хворі будуть страждати від спонтанної кровотечі в суглобах, яка приводить до сильного болю і від шкідливої для здоров'я відсутності рухливості; кровотечі в м'язах, що
10 приводять до акумуляції крові в цих тканинах; спонтанної кровотечі в горлі й шиї, яка за відсутності невідкладного лікування може спричинити асфіксію; ниркової кровотечі; поширені також тяжкі кровотечі після хірургічного втручання, незначних випадкових ушкоджень або видалення зубів.

15 [03] Нормальна коагуляція крові *in vivo* потребує як мінімум серинових протеаз Факторів II (протромбін), VII, IX, X і XI (розчинних білків плазми); кофакторів, що включають трансмембранний білковий тканинний фактор і плазматичні білкові Фактори V і VIII; фібриноген, трансклотаминазу Фактор XIII, фосфоліпід (включаючи активовані тромбоцити) і кальцій. Додаткові білки, що включають калікреїн, кініноген високої молекулярної маси і Фактор XII є необхідними в деяких із тестів згортання *in vitro*, і можуть відігравати роль при патологічних
20 порушеннях *in vivo*.

[04] При гемофілії згортання крові порушується через відсутність певних плазматичних факторів згортання крові. Причиною гемофілії В є дефіцит Фактора IX, що може бути результатом як зменшення синтезу білка Фактора IX, так і дефективною молекулою зі зниженою активністю. Лікування гемофілії проводять шляхом заміщення відсутнього фактора згортання
25 екзогенними концентратами фактора, високо збагаченими Фактором IX. Однак виробництво такого концентрату із крові пов'язане з великою кількістю технічних труднощів, як описано нижче.

[05] При очищенні Фактора IX із плазми (одержаний із плазми Фактор IX; pdFIX) майже виключно виходить активний Фактор IX. Однак таке очищення фактора IX із плазми є дуже
30 важким, оскільки Фактор IX представлений у плазмі тільки у низькій концентрації (5 мкг/мл. Andersson, Thrombosis Research 7: 451 459 (1975). Крім того, очищення з крові потребує видалення або інактивації інфекційних агентів, таких як ВІЛ і вірус гепатиту С. Більше того, pdFIX має короткий період напіввиведення і, отже, потребує частого дозування. Рекombінантний фактор IX (rFIX) також є доступним, але має такий самий короткий період напіввиведення і
35 потребує такого ж частого дозування, як і pdFIX (наприклад, 2-3 рази на тиждень для профілактики). rFIX також володіє нижчим значенням поступового відновлення (К значенням) порівняно з pdFIX, що робить необхідним застосування більш високих доз rFIX, порівняно з pdFIX.

[06] Зниження смертності, запобігання ушкодженню суглобів і покращена якість життя стали
40 важливим досягненням внаслідок розробки одержаного із плазми і рекombінантного Фактора IX. Пролонгований захист від кровотечі стане іншим значним прогресом у лікуванні пацієнтів з гемофілією В. Однак на теперішній час не розроблені продукти, які надавали би пролонгований захист. Отже, залишається необхідність в удосконалених способах лікування гемофілії, що виникла внаслідок нестачі Фактора IX, які б краще переносились і були би більш ефективними,
45 ніж існуючі способи терапії.

СУТЬ ВІНАХОДУ

[07] Даний винахід пропонує способи введення Фактора IX із застосуванням хімерних поліпептидів, що містять Фактор IX, і гібридів таких хімерних поліпептидів; полінуклеотидів, що
50 кодують такі хімерні й гібридні поліпептиди; клітин, що містять такі полінуклеотиди; і способи виробництва таких хімерних і гібридних поліпептидів з використанням таких клітин. У деяких варіантах втілення Фактор IX хімерний поліпептид являє собою Фактор IX FcRn зв'язувальний партнер (BP) хімерний поліпептид, такий як Фактор IX Fc хімерний поліпептид. В інших варіантах втілення Фактор IX хімерний поліпептид являє собою Фактор IX-XTEN поліпептид.

[08] Даний винахід надає спосіб введення Фактора IX пацієнту, який потребує цього, включаючи введення пацієнту дози щонайменше приблизно 10, щонайменше приблизно 20, або
55 щонайменше приблизно 25 МО/кг Фактора IX FcRn BP хімерного поліпептиду, наприклад, Фактора IX-Fc хімерного поліпептиду або Фактора IX-XTEN хімерного поліпептиду, з інтервалом між введенням лікарського засобу приблизно один раз на тиждень або рідше.

[09] У деяких варіантах втілення концентрація в плазмі крові хімерного поліпептиду досягає
60 середнього мінімального значення щонайменше приблизно 1 МО/дл через щонайменше

приблизно 6 днів у щонайменше приблизно 70%, щонайменше приблизно 80%, щонайменше приблизно 90%, або приблизно 100% популяції пацієнтів, або досягає у пацієнта мінімального значення щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4 або 5 МО/дл через щонайменше приблизно 6 днів. У деяких варіантах втілення рівень у плазмі вищезгаданого хімерного поліпептиду досягає середнього мінімального значення приблизно 1-5 або 1-3 МО/дл. Таке мінімальне або середнє мінімальне значення може бути досягнуте після приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13, приблизно 14, приблизно 15, приблизно 16, приблизно 17, приблизно 18, приблизно 19, приблизно 20, приблизно 21, приблизно 22, приблизно 23, приблизно 24, приблизно 25, приблизно 26, приблизно 27, приблизно 28, приблизно 29, приблизно 30, приблизно 31, приблизно 32, приблизно 33, приблизно 34, приблизно 35, приблизно 36, приблизно 37, приблизно 38, приблизно 39 або приблизно 40 днів.

[010] У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид має сильно редуковану фосфорилізацію і сульфатацію порівняно з одержаним із плазми Фактором IX. У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид є менше, ніж на 25% фосфорильованим і менше, ніж на 25% сульфатованим, наприклад, менше, ніж на 25% повністю повністю фосфорильованим і сульфатованим. У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид є менше, ніж приблизно на 10% фосфорильованим і менше, ніж приблизно на 9% сульфатованим. У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид має паттерн / розподілення гама карбоксилування, вміст гама карбоксилування, паттерн / розподілення сialування, і / або вміст сialування, подібний (тобто в межах 10%) або такий самий як у Фактора IX Fc хімерного поліпептиду в Прикладах 5-6.

[011] У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид має поступове відновлення більше ніж 0,7 або більше, ніж 0,75 мкг/мл (антиген). У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид має середнє поступове відновлення (К-значення) (активність; спостережуване) щонайменше приблизно 0,8, щонайменше приблизно 0,9, або щонайменше приблизно 1 МО/дл на МО/кг.

[012] У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид демонструє один або більше фармакокінетичних параметрів у зазначеній популяції пацієнтів або у зазначеного пацієнта, обраного із групи, що складається з:

[013] (а) середній кліренс (CL) (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно $3,36 \pm 0,93$ мл/год/кг; середній кліренс (CL) (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 3,0-3,72, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, або 3,72 мл/год./кг; середній кліренс (CL) (активність) у зазначеній популяції пацієнтів, приблизно у 2,5 рази нижче, ніж кліренс поліпептиду, що містить зазначений Фактор IX без зазначеного FcRn BP; кліренс (CL) (активність) у зазначеного пацієнта становить приблизно 1,84 - 4,58 мл/год./кг.

[014] (б) середній час затримання (MRT) (активність) у зазначеній популяції пацієнтів є не меншою, ніж приблизно $68,05 \pm 11,16$ годин; середнє MRT (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 60-78, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 або 78 годин; середній MRT (активність) у зазначеній популяції пацієнтів є приблизно втричі довшим, ніж середній MRT поліпептиду, що містить зазначений Фактор IX без зазначеного FcRn BP; середній час затримання (MRT) (активність) у зазначеного пацієнта становить приблизно 53,1-85,8 годин; середній час затримання (MRT) (активність) у зазначеного пацієнта становить щонайменше приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85, або приблизно 90 годин;

[015] (в) середній $t_{1/2\beta}$ (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно $52,5 \pm 9,2$ годин; середній $t_{1/2\beta}$ (активність) у зазначеній популяції пацієнтів, становить приблизно 47 - 60 годин, приблизно 47, приблизно 48, приблизно 49, приблизно 50, приблизно 51, приблизно 52, приблизно 53, приблизно 54, приблизно 55, приблизно 56, приблизно 57, приблизно 58, приблизно 59, приблизно 60 годин; середній $t_{1/2\beta}$ (активність) у зазначеній популяції пацієнтів, приблизно в 3 рази довше, ніж середнє $t_{1/2\beta}$ поліпептиду, що містить зазначений Фактор IX без зазначеного FcRn BP; $t_{1/2\beta}$ (активність) у зазначеного пацієнта становить приблизно 40 - 67,4, приблизно 40, приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70 або приблизно 75 годин;

[016] (г) середнє поступове відновлення (К значення) (активність; спостережуване) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно $0,93 \pm 0,18$ МО/дл на МО/кг; середнє поступове відновлення (К значення) (активність; спостережуване) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 0,85 - 1,0, приблизно 0,85, приблизно 0,86, приблизно 0,87, приблизно 0,88, приблизно 0,89, приблизно 0,90, приблизно 0,91, приблизно 0,92, приблизно 0,93, приблизно 0,94, приблизно 0,95, приблизно 0,96, приблизно 0,97, приблизно 0,98, приблизно 0,99, приблизно 1,0, приблизно 1,05, приблизно 1,10 або приблизно 1,15 МО/дл на

МО/кг; середнє поступове відновлення (К значення) (активність; спостережуване) у зазначеній популяції пацієнтів, приблизно на 24% краще, ніж середнє поступове відновлення поліпептиду, що містить зазначений Фактор IX без зазначеного FcRn BP; поступове відновлення (К значення) (активність; спостережуване) у зазначеного пацієнта становить приблизно 0,62 - 1,17 МО/дл на

5

МО/кг;
[017] (д) середній Vss (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 226 ± 67,76 (скоректований до 69,8) мл/кг; середній Vss (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 200 - 300, приблизно 200, приблизно 210, приблизно 220, приблизно 230, приблизно 240, приблизно 250, приблизно 260, приблизно 270, приблизно 280, приблизно 290 або приблизно 300 мл/кг; Vss (активність) у зазначеного пацієнта становить приблизно 145 - 365 мл/кг;

10

[018] (f) середня AUC/доза (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 32,44 ± 10,75 МО*год/дл на МО/кг; середня AUC/доза (активність) у зазначеній популяції пацієнтів становить приблизно 26 - 40, приблизно 26, приблизно 27, приблизно 28, приблизно 29, приблизно 30, приблизно 31, приблизно 32, приблизно 33, приблизно 34, приблизно 35, приблизно 36, приблизно 37, приблизно 38, приблизно 39 або приблизно 40 МО*год/дл на МО/кг; AUC/доза у зазначеного пацієнта становить приблизно 21,80 – 54,30 МО*год/дл на МО/кг.

15

[019] У деяких варіантах втілення доза хімерного поліпептиду містить значно більш низьку (в 10-100 раз) концентрацію (0,01-0,001%) активованого FIX (FIXa), ніж у продуктах Фактора IX, що виробляються на даний час, таких як MONONINE™ (pdFIX; CSL Behring)) або BENEFIX™ (Wyeth; rFIX) (0,1%). Така концентрація може бути в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 разів нижчою, ніж у продуктів, що виробляються на даний час або становити 0,01, 0,05, 0,0033, 0,0025, 0,002, 0,00167, 0,00142, 0,00125, 0,00111 або 0,001%.

20

[020] У деяких варіантах втілення інтервал між введенням лікарського засобу становить 6 - 18, 6 - 10, 9 - 18, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 11, щонайменше 12, щонайменше 13, щонайменше 14, щонайменше 15, щонайменше 16, щонайменше 17, або щонайменше 18 днів, щотижня, двічі на місяць, або один раз на місяць. Інтервал між введенням лікарського засобу може бути профілактичним інтервалом між введенням лікарського засобу, фіксованим профілактичним інтервалом між введенням лікарського засобу або індивідуалізованим профілактичним інтервалом між введенням лікарського засобу.

25

[021] Способи винаходу застосовуються до пацієнта, який потребує контролю або запобігання кровотечі або епізодів кровотечі, який потребує інтермітуючої терапії, який потребує профілактичного лікування або який потребує лікування за вимогою.

30

[022] Терапевтичні дози, які можуть бути застосовані в способах винаходу, становлять приблизно 25-180, приблизно 20-180, приблизно 20-50, приблизно 20-100, приблизно 10-180, приблизно 10-50, приблизно 10-30 або приблизно 50-100 МО/кг. Доза може бути фіксованою дозою або індивідуалізованою дозою.

40

[023] У деяких варіантах втілення хімерний поліпептид вводять внутрішньовенно або підшкірно.

[024] Суб'єктом у способах винаходу може бути суб'єкт-людина або ссавець, що не є людиною. Ссавці, що не є людьми, включають мишей, собак, приматів, мавп, кішок, коней, корів, свиней і інших свійських тварин і маленьких тварин.

45

[025] Хімерний поліпептид може бути у формі гібрида, що містить другий поліпептид у поєднанні із зазначеним хімерним поліпептидом, при цьому зазначений другий поліпептид містить або складається переважно з FcRn BP, наприклад, Fc. Хімерний поліпептид може бути щонайменше на 90%, щонайменше на 95% або 100% ідентичний послідовності Фактора IX, послідовності Fc або як послідовності Фактора IX, так і послідовності Fc у Таблицях 2A (SEQ ID NO:2) і/або 2B (SEQ ID NO:4), з сигнальною послідовністю (ями) і поліпептидом або без них.

50

[026] Хімерний поліпептид або гібрид може вводиться як частина фармацевтичної композиції, що містить щонайменше одну допоміжну речовину.

[027] Винахід також надає самі вищеописані хімерні й гібридні поліпептиди, полінуклеотиди, що їх кодують, людські ембріональні клітини, що культивуються, які містять полінуклеотиди, і способи виробництва таких хімерних і гібридних поліпептидів, і поліпептиди, що виробляються такими способами.

55

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

[028] ФІГ. 1. Схема одного типу Фактора IX хімерного поліпептиду, Фактора IX-Fc гібрида.

[029] ФІГ. 2. Групова середня концентрація FIXFc у порівнянні з часовими профілями; порівняння номінальної дози.

60

[030] ФІГ. 3. Групова середня активність FIXFc у порівнянні з часовими профілями; порівняння номінальної дози.

[031] ФІГ. 4. Дерево розв'язків віднімання базового рівня.

[032] ФІГ. 5. Пропорційне дозі зростання St_{max} і AUC для FIX активності.

5 [033] ФІГ. 6. Оцінена терапевтична тривалість rFIXFc при 50 (А) і 100 (Б) МО/кг.

[034] ФІГ. 7. Пропорційне дозі зростання St_{max} і AUC для FIX антигена.

[035] ФІГ. 8. Фармакокінетичні оцінки для rFIXFc антигена при 50 (А) і 100 (Б) МО/кг номінальних дозах.

10 [036] ФІГ. 9. Точна кореляція між rFIXFc активністю і рівнями антигена. Необхідно відзначити, що внаслідок перерахунку РК активності, як обговорюється в Прикладі 11, $R^2 = 0,946$.

15 [037] ФІГ. 10. rFIX-Fc доменна структура і посттрансляційні модифікації. PRO: пропептид, розщеплений процесуючим ферментом. GLA: містить 12 γ -карбоксильованих залишків глутамінової кислоти (Gla). ACT PEP: активаційний пептид розщеплюється для одержання активної протеази. Інші модифікації: N- і O- глікозилювання, Asp(64) β -гідроксилювання, Туг сульфатація, Ser фосфорилування.

20 [038] ФІГ. 11. SDS-PAGE гель очищення проміжних продуктів і очищеного FIXFc мономера. Проби з різних етапів очищення FIXFc аналізували за допомогою невідновлювального SDS-PAGE. Доріжка 1: Маркери SeeBlue плюс молекулярної маси (Invitrogen). Доріжка 2: порожня доріжка. Доріжка 3: Білок А завантажений. Доріжка 4: Білок А елюат. Доріжка 5: Фрактогель DEAE елюат. Доріжка 6: Q Seph FF елюат. Доріжка 7: кінцевий об'єм FIXFc. Доріжка 8: порожня доріжка. Доріжка 9: кінцевий об'єм редукованого FIXFc.

25 [039] ФІГ. 12. Функціональна активність FIXFc у дефіцитних за FIX мишей. Дефіцитним за FIX мишам була внутрішньовенно введена доза 219 МО/кг FIXFc (3 або 4 на групу, 6 груп, $n = 23$) або 200 МО/кг rFIX (3 або 4 на групу, 5 груп, $n = 23$) в час = 0. Проби крові відбирали в різний час після введення дози (від 0,25 год. до 96 год) і аналізували на активність згортання з використанням аналізу FIX активності. * rFIX активність не визначалась у всіх мишей в точках часу через 48 год. після введення дози.

30 [040] ФІГ. 13. Час згортання цільної крові FIXFc у порівнянні з рекомбінантним FIX у дефіцитних по FIX мишей. Дефіцитні по FIX миші (6 на групу) одержали внутрішньовенно дозу 50 МО/кг FIXFc або 50 МО/кг rFIX. Проби крові відбирали перед введенням дози і в різний час після введення дози. Проби крові інкубували за температури 37°C і візуально перевіряли на присутність згустків крові один раз на хвилину. Відзначався час, необхідний для формування згустків крові, і коли активність згортання поверталася до базового рівня (тобто згустки не формувалися), додаткові проби не одержували (проби збиралися від 15 хв. до 144 год. для FIXFc або від 15 хв. до 72 год. для rFIX).

35 [041] ФІГ. 14. Фармакодинаміка FIXFc у дефіцитних за FIX мишей. Дефіцитним за FIX мишам була введена доза 219 МО/кг FIXFc (5 на групу, 6 груп, $n = 30$) або 200 МО/кг rFIX (4 або 5 на групу, 6 груп, $n = 28$) на День 0, 4 і 8. Проби плазми крові відбирали шляхом пункції серця через 15 хв. і 96 год. після введення кожної дози і вимірювали активність згортання з використанням аналізу FIX активності. Плазму також відбирали із крові хвоста через 8, 24, 48 і 72 год. після введення кожної дози. Рівні FIXFc були виміряні у всіх пробах з використанням аналізу ELISA, специфічного для FIXFc. (А) Виміряна активність порівняно з розрахованою активністю. Активність згортання для FIXFc розраховували з використанням аналізу FIX активності через 15 хв. і 96 год. після введення трьох доз. Було визначено, що активність згортання *in vitro* для FIXFc становила $43,8 \pm 5,4$ МО/мг. ґрунтуючись на цій активності (МО/мг) і виміряних рівнях білка, розрахований рівень активності згортання був визначений в точках часу 15 хв, 8, 24, 48, 72 і 96 год. після введення кожної дози. (Б) У дефіцитних за FIX мишей, яких пролікували трьома дозами 200 МО/кг rFIX, рівні FIX були розраховані з використанням FIX-специфічного аналізу ELISA. Використовуючи виміряні показники специфічної активності FIXFc і rFIX, стало можливим порівняти розраховану активність згортання для всіх проб, проаналізованих за допомогою ELISA.

40 [042] ФІГ. 15. Фармакокінетика і фармакодинаміка FIXFc у дефіцитних за FIX собак. Двом собакам з гемофілією В ввели шляхом внутрішньовенної інфузії 140 МО/кг FIXFc. Проби крові відбирали через 5, 15 і 30 хв, і через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 27, 30, 48, 51, 54, 72, 80, 96, 126, 144 і 168 год. (А) Метод сендвіч-ELISA з використанням FIX імобілізованого антитіла і Fc-HRP ідентифікуючого антитіла був використаний для вимірювання концентрації інтактного FIXFc у пробах крові собак з гемофілією В. (Б) FIX активність згортання вимірювали у всіх точках часу відносно стандартної кривої, сгенерованої з FIXFc. (В) Кров, відібрану у тварин, негайно аналізували на час згортання цільної крові. Проби крові інкубували за температури 28°C і

візуально перевіряли на присутність згустків крові один раз на хвилину, і реєстрували час, за який формувався згусток.

[043] ФІГ. 16. Фармакокінетика FIXFc у яванських макак. Макакам була введена однократна доза (0,5, 2 і 10 мг/кг, що відповідає приблизно 25, 100 або 500 МО/кг) FIXFc (n = 2, 3 і 3, відповідно). Проби крові відбирали через 0,25, 0,5, 1, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 і 168 год. після введення дози і плазму готували для аналізу концентрації білка за допомогою FIXFc-специфічного ELISA.

[044] ФІГ. 17. rFIXFc і BENEFIX™ демонструють порівнянну активність і залежну від дози реакцію в цільній крові мишей з HemB. (А) Параметри аналізу ROTEM®. rFIX або BENEFIX™ додавали в кров HemB мишей і вимірювали параметри згортання за допомогою аналізу ROTEM®. (б)-(г)Залежна від дози відповідь, вимірювання (б) СТ, (в)CFT і (г)альфа-кут.

[045] ФІГ. 18. Визначення ефективності у невідкладних випадках у моделі відсікання хвоста у мишей з гемофілією.

[046] ФІГ. 19. (А) Втрата крові після відрізання хвоста у окремих HemB мишей, пролікованих rFIXFc або BENEFIX™. (б) Залежна від дози реакція на rFIXFc і BENEFIX™ за медіанною втратою крові після відрізання хвоста у HemB мишей.

[047] ФІГ. 20. Модель кровотечі при розсіченні хвостової вени (TVT) у HemB мишей: модель для характеристики венозної кровотечі у пацієнтів з важкою гемофілією.

[048] ФІГ. 21. Пролонгована активність rFIXFc у порівнянні з BENEFIX™ у дослідних HemB мишей за результатами аналізу ROTEM® цільної крові. (А) СТ, (б) CFT, (в)Альфа-кут, і (г)часткова кореляція між активністю згортання цільної крові (СТ) за ROTEM® у порівнянні з плазматичною активністю за aPTT.

[049] ФІГ. 22. Пролонгована ефективність FIXFc у порівнянні з BENEFIX™ у моделі кровотечі при розсіченні хвостової вени (TVT) у HemB мишей. (А) Виживаність: ступені виживаності порівнювали у мишей, які одержували BENEFIX™ за 24 години до TVT, і у мишей, які одержували rFIXFc за 72 години до TVT, і (б) Зупинка кровотечі: ступені кровотечі порівнювали у мишей, які одержували BENEFIX™ за 24 години до TVT, і у мишей, які одержували rFIXFc за 72 години перед TVT.

[050] ФІГ. 23. Кореляція між поступовим відновленням активного rFIXFc відносно маси тіла у 12 пацієнтів, які одержували однократну дозу 12,5 - 100 МО/кг rFIXFc.

[051] ФІГ. 24. Моделювання за способом Монте-Карло з використанням структурної РК моделі rFIXFc активності для створення профілів активність-час для досягнення мінімального рівня 1 МО/дл вище базового рівня після щотижневого (А), кожні 10 днів (б) або кожні два тижні режиму дозування (С). Медіанні РК параметри популяції і релевантні варіації між пацієнтами і у одного пацієнта були взяті з Фази 1/2а клінічного дослідження. 1000 суб'єктів увійшли в моделювання дозового режиму з 14-16 точками відбору проб для кожного суб'єкта, і середні значення \pm SD профілів активність-час від 1000 суб'єктів були сконструйовані графічно для різних режимів дозування.

[052] ФІГ. 25. Моделювання за способом Монте-Карло для rFIXFc доз для досягнення мінімального рівня 1 МО/дл (1%), на основі перерахованих фармакокінетичних даних. (А) один раз на тиждень, (б) кожні 10 днів, і (в)кожні два тижні.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[053] Даний винахід надає спосіб лікування нестачі Фактора IX, наприклад, гемофілії В, Фактором IX, з застосуванням більш тривалого інтервалу між введенням лікарського засобу і/або покращених фармакокінетичних параметрів, ніж це можливо з відомими на даний час продуктами з Фактором IX. Даний винахід також надає покращені Фактор IX хімерні поліпептиди, Фактор IX хімерні полінуклеотиди і способи їх виробництва.

[054] "Введення", як використовується тут, означає надання фармацевтично прийнятного Фактор IX поліпептиду винаходу пацієнту фармацевтично прийнятним способом. Кращими способами введення є внутрішньовенні, наприклад, внутрішньовенна ін'єкція і внутрішньовенна інфузія, наприклад, за допомогою центрального венозного доступу. Додаткові шляхи введення включають підшкірне, внутрішньом'язове, пероральне, назальне і пульмонарне введення, краще підшкірне. Фактор IX хімерні поліпептиди і гібридні білки можуть бути введені як частина фармацевтичної композиції, що містить щонайменше одну допоміжну речовину. Переваги даного винаходу включають: покращене дотримання режиму; зниження ушкоджень через кровотечу; підвищений захист суглобів від кровотеч; профілактику ушкодження суглобів; знижену болісність; знижену смертність; пролонгований захист від кровотечі; зниження тромботичних випадків; і покращену якість життя.

[055] "Хімерний поліпептид" при використанні тут, означає поліпептид, який містить у собі щонайменше два поліпептиди (або їх частини, такі як субпослідовності або пептиди) із різних

джерел. Хімерні поліпептиди можуть включати два, три, чотири, п'ять, шість, сім або більше поліпептидів або їх частин з різних джерел, таких як різні гени, різні кДНК або різні тварини, або інші види. Хімерні поліпептиди можуть включати один або більше лінкерів, що зв'язують різні поліпептиди або їх частини. Таким чином, поліпептиди або їх частини можуть бути з'єднані
 5 прямо або вони можуть бути з'єднані непрямо, за допомогою лінкерів, або обома способами, з одним хімерним поліпептидом. Хімерні поліпептиди можуть включати додаткові пептиди, такі як сигнальні послідовності й такі послідовності як 6His і FLAG, що сприяє очищенню або детекції білка. Крім того, хімерні поліпептиди можуть мати амінокислотні або пептидні добавки на N-і/або C-кінці. Прикладами хімерних поліпептидів винаходу є Фактор IX-FcRn BP хімерні
 10 поліпептиди, наприклад, Фактор IX-Fc хімерні поліпептиди, такі як FIXFc на Фігурі 1, SEQ ID NO:2 (Таблиця 2) і Приклади 1-4, зі своєю сигнальною послідовністю або без і пропептид. Інші приклади хімерних поліпептидів винаходу включають, не обмежуючись перерахованим, Фактор IX-XTEN хімерні поліпептиди. Фактор IX може бути гібридизований або з N-кінцем, або з C-кінцем XTEN.

15 [056] Хімерний поліпептид може містити послідовність, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% або 100% ідентичну Фактору IX і FcRn BP, наприклад, Fc амінокислотну послідовність, показану в Таблиці 2A без сигнальної послідовності і пропептидної послідовності (амінокислоти з 1 по 642 з SEQ ID NO:2), або альтернативно, з пропептидною послідовністю, або альтернативно з сигнальною послідовністю і пропептидною послідовністю.

20 [057] "Культура", "культивування" і "культивування" як використовується тут, означає інкубувати клітини в умовах *in vitro*, які дають клітинам можливість рости або ділитися, або підтримують клітини в живому стані. "Клітини, що культивуються" при використанні тут означає клітини, які розмножуються *in vitro*.

25 [058] "Фактор IX" і "FIX" при використанні тут означає функціональний Фактор IX поліпептид у своїй нормальній ролі в коагуляції, якщо не зазначене інше. Таким чином, термін Фактор IX включає різні поліпептиди, які є функціональними, і полінуклеотиди, які кодують такі функціональні варіанти поліпептидів. Кращі Фактор IX поліпептиди являють собою людські, бичачі, свинячі, собачі, котячі й мишачі Фактор IX поліпептиди. Відомі поліпептиди повної
 30 довжини і полінуклеотидні послідовності Фактора IX, а також багато функціональних варіантів, наприклад, фрагменти, мутанти і модифіковані версії. Фактор IX поліпептиди включають повної довжини Фактор IX, повної довжини Фактор IX без Met на N-кінці, повної довжини Фактор IX без сигнальної послідовності, зрілий Фактор IX (без сигнальної послідовності й пропептиду), і зрілий Фактор IX з додатковим Met на N-кінці. Фактор IX краще виробляється рекомбінантними способами ("рекомбінантний Фактор IX" або "rFIX"), тобто він не є природним або одержаним із
 35 плазми крові.

[059] Відомо дуже багато функціональних варіантів Фактора IX. Міжнародна публікація номер WO 02/040544 A3, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває мутанти, які демонструють підвищену стійкість до інгібування гепарином, на сторінці
 40 4, рядки 9-30, і на сторінці 15, рядки 6-31. Міжнародна публікація номер WO 03/020764 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває мутанти Фактора IX з редукованою імуногенністю Т-клітин у Таблицях 2 і 3 (на сторінках 14-24), і на сторінці 12, рядки 1-27. Міжнародна публікація номер WO 2007/149406 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває функціональний мутант Фактора IX молекул, який демонструє підвищену білкову стабільність, підвищений період напіввиведення *in vivo* і *in vitro* і
 45 підвищену стійкість до протеаз від сторінки 4, рядок 1 до сторінки 19, рядок 11. WO 2007/149406 A2 також розкриває хімерний і інший варіант Фактора IX молекул від сторінки 19, рядок 12 до сторінки 20, рядок 9. Міжнародна публікація номер WO 08/118507 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває мутанти Фактора IX, які демонструють підвищену активність згортання крові, від сторінки 5, рядок 14 до сторінки 6,
 50 рядок 5. Міжнародна публікація номер WO 09/051717 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває мутанти Фактора IX, що мають підвищене число N-зв'язаних і/або O-зв'язаних сайтів глікозилювання, яке приводить до зростання періоду напіввиведення і/або затримання, від сторінки 9, рядок 11 до сторінки 20, рядок 2. Міжнародна публікація номер WO 09/137254 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою
 55 посилання, також розкриває мутанти Фактора IX з підвищеним числом сайтів глікозилювання від сторінки 2, параграф [006] до сторінки 5, параграф [011] і від сторінки 16, параграф [044] до сторінки 24, параграф [057]. Міжнародна публікація номер WO 09/130198 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває функціональний мутант Фактора IX молекул, який має підвищене число сайтів глікозилювання, що приводить до зростання
 60 періоду напіввиведення, від сторінки 4, рядок 26, до сторінки 12, рядок 6. Міжнародна публікація

номер WO 09/140015 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, розкриває функціональні Фактор IX мутанти, які мають підвищену кількість Cys залишків, що може бути використане для полімерної (наприклад, PEG) кон'югації, від сторінки 11, параграф [0043] до сторінки 13, параграф [0053].

5 [060] Крім того, сотні нефункціональних мутацій Фактора IX ідентифіковані у пацієнтів з гемофілією, багато з яких розкриті в Таблиці 1, на сторінках 11-14 Міжнародної публікації номер WO 09/137254 A2, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. Такі нефункціональні мутації не включені у винахід, але надають додатковий посібник того, які мутації з більшою або меншою імовірністю приведуть до одержання функціонального Фактор IX

10 поліпептиду.
[061] Фактор IX (або Фактор IX частина хімерного поліпептиду) може бути щонайменше на 90% або щонайменше на 95% або щонайменше на 100% ідентичним Фактору IX амінокислотної послідовності, показаної в Таблиці 2A без сигнальної послідовності і пропептидної послідовності (амінокислоти з 1 по 415 з SEQ ID NO:2), або альтернативно, з пропептидною послідовністю, або з пропептидною і сигнальною послідовністю (повної довжини Фактор IX).

[062] Коагуляційна активність Фактора IX виражається в Міжнародних Одиницях (МО). Одна МО активності Фактора IX відповідає приблизно кількості Фактора IX в одному мілілітрі нормальної плазми крові людини. Деякі дослідження підходять для вимірювання активності Фактора IX, включаючи одностадійне дослідження згортання крові (активованій частковий

20 тромбопластинний час; aPTT), час утворення тромбіну (TGA) і ротаційна тромбоеластографія (ROTEM®). Див., наприклад, Приклад 3.
[063] "FcRn зв'язувальний партнер" або "FcRn BP" при використанні тут, означає зв'язувальні партнери функціонального неонатального Fc рецептора (FcRn), якщо не зазначене інше. FcRn зв'язувальний партнер є будь-якою молекулою, яка може специфічно зв'язуватися з FcRn рецептором з наступним активним транспортом FcRn рецептором FcRn зв'язувального партнера. Таким чином, термін FcRn BP включає будь-які варіанти IgG Fc, які є функціональними. Наприклад, область Fc частини IgG, яка зв'язується з FcRn рецептором, описана на основі рентгеноструктурної кристалографії (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379, включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання). Головна контактна ділянка Fc з FcRn знаходиться поруч із з'єднанням CH2 і CH3 доменів. Всі Fc-FcRn контакти знаходяться усередині одного Ig важкого ланцюга. FcRn Bps включають цілий IgG, Fc фрагмент IgG, і інші фрагменти IgG, які включають повний зв'язувальний регіон FcRn. Головні контактні сайти включають амінокислотні залишки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 і 314 CH2 домену і амінокислотні залишки 385-387, 428 і 433-436 CH3 домену. Всі посилання щодо амінокислотної нумерації імуноглобулінів або фрагментів імуноглобулінів, або ділянок, засновані на роботі Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. (FcRn рецептор виділений з декількох видів ссавців, включаючи людину. Відомі послідовності людських FcRn, щурячих FcRn і мишачих FcRn (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180: 2377), включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.) FcRn BP може містити CH2 і CH3 домени імуноглобулінів з петльовими ділянками імуноглобуліну або без них. Наведені як приклад FcRn BP варіанти надані в WO 2004/101740 і WO 2006/074199, які включені в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

45 [064] FcRn BP також включає альбумін і його фрагменти, які зв'язуються з FcRn. Краще альбумін являє собою альбумін людини. Фактор IX може бути з'єднаний або з N-кінцем альбуміну або з C-кінцем альбуміну, за умови, що Фактор IX компонент Фактор IX-альбумін гібридного білка може процесуватися ферментативно активною пропротеїнконвертазою для одержання процесованого поліпептиду, що містить Фактор IX. Приклади альбуміну, такі як його фрагменти, які можна використовувати в даному винаході, відомі, наприклад, Патент США No. 7592010; Патент США No. 6686179; і Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009), кожний з яких включений у дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

[065] FcRn BP (або ділянка FcRn BP у хімерному поліпептиді) може містити одну або більше мутацій, і комбінацій мутацій.

55 [066] FcRn BP ((або ділянка FcRn BP у хімерному поліпептиді) може містити мутації, що надають збільшений період напіврозпаду, такі як M252Y, S254T, T256E і їх комбінації, як розкрито в роботі Oganessian et al., Mol. Immunol. 46:1750 (2009), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання; H433K, N434F і їх комбінації, як розкрито в роботі Vassago et al., Nat. Biotechnol. 23:1283 (2005), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання; мутанти розкриті на сторінках 1-2, параграф [0012], і в Прикладах 9 і 10 США

2009/0264627 A1, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання; і мутанти розкриті на сторінці 2, параграфи з [0014] по [0021] зі США 20090163699 A1, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

[067] FcRn BP (або ділянка FcRn BP у хімерному поліпептиді) також може включати наступні мутації: Fc регіон IgG може бути модифікований відповідно до добре відомих процедур, таких як сайт-спрямований мутагенез і подібними для одержання модифікованих IgG або Fc фрагментів або їх частин, які будуть зв'язуватися з FcRn. Такі модифікації включають модифікації, далекі від контактуючих сайтів FcRn, а також модифікації в межах контактуючих сайтів, які зберігають або навіть підсилюють зв'язування з FcRn. Наприклад, наступні одиночні амінокислотні залишки у людському IgG1 Fc (Fcy1) можуть бути заміщені без значної втрати Fc зв'язувальної афінності для 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, де наприклад P238A представляє дикий тип проліну, заміщений аланіном у позиції номер 238. На додаток до аланіну, інші амінокислоти можуть бути заміщені диким типом амінокислот у позиціях, позначених вище. Мутації можуть бути впроваджені однократно в Fc, даючи початок більше, ніж одній сотні FcRn зв'язувальних партнерів, що відрізняються від нативного Fc. Крім того, комбінації двох, трьох або більше із цих індивідуальних мутацій можуть бути введені разом, даючи початок ще сотням FcRn зв'язувальних партнерів. Деякі із цих мутацій можуть давати нову функціональність відносно FcRn зв'язувального партнера. Наприклад, один варіант втілення включає N297A, видаляючи висококонсервативний сайт N-глікозилування. Дія цієї мутації зменшує імуногенність, тим самим підсилюючи циркулюючий півперіод FcRn зв'язувального партнера, і компенсуючи нездатність FcRn зв'язувального партнера зв'язуватися з FcyRI, FcyRIIA, FcyRIIB і FcyRIIIA, без афінності до FcRn, що заважає (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання). Крім того, щонайменше три людські Fc гама рецептора, очевидно, розпізнають сайт зв'язування IgG усередині нижньої петльової ділянки, звичайно амінокислоти 234-237. Отже, інший приклад нової функціональності й потенційно зниженої імуногенності може стати результатом мутацій у цій ділянці, як, наприклад, шляхом заміщення амінокислот 233-236 людського IgG1 "ELLG" на відповідну послідовність із IgG2 "PVA" (з однією амінокислотою делецією). Показано, що FcyRI, FcyRII і FcyRIII, які опосередковують різні ефекторні функції, не будуть зв'язуватися з IgG1, якщо інтродуковані такі мутації. (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання; і Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання). Як додатковий приклад нової функціональності, що виникає внаслідок мутацій, описаних вище, в деяких випадках афінність до FcRn може бути підвищена більше, ніж у дикого типу. Ця підвищена афінність може відображати підвищений ступінь «увімкнення», знижений ступінь «вимкнення» або як підвищений ступінь «увімкнення», так і знижений ступінь «вимкнення». Вважається, що мутації надають підвищену афінність FcRn, включаючи T256A, T307A, E380A і N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання).

[068] FcRn BP (або ділянка FcRn BP у хімерному поліпептиді) може бути щонайменше на 90% або щонайменше на 95% або на 100% ідентичною Fc амінокислотної послідовності, показаної в Таблиці 2A або B без сигнальної послідовності (амінокислоти від 1 до 227 з SEQ ID NO:2), або альтернативно, із сигнальною послідовністю.

[069] Термін "гібридні" поліпептиди і білки, при використанні тут, означає комбінацію хімерного поліпептиду з другим поліпептидом. Хімерний поліпептид і другий поліпептид у гібриді можуть бути зв'язані один з одним за допомогою нековалентних взаємодій білок-білок, таких як заряд-заряд або гідрофобні взаємодії. Хімерний поліпептид і другий поліпептид у гібриді можуть бути зв'язані один з одним через ковалентний зв'язок (зв'язки), такі як дисульфідні зв'язки. Хімерний поліпептид і другий поліпептид у гібриді можуть бути зв'язані один з одним за допомогою більше ніж одного типу зв'язку, таких як нековалентні й дисульфідні зв'язки. Гібриди

описані в WO 2004/101740, WO2005/001025, Патенті США No. 7,404,956, патенті США No. 7,348,004 і WO 2006/074199, кожний з яких включений в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. Другий поліпептид може бути другою копією того ж хімерного поліпептиду або може бути неідентичним хімерним поліпептидом. У кращих варіантах втілення

5 другий поліпептид являє собою поліпептид, що містить FcRn BP, наприклад, Fc. У кращих варіантах втілення хімерний поліпептид являє собою Фактор IX-FcRn BP, наприклад, Фактор IX-Fc хімерний поліпептид, а другий поліпептид повністю складається з Fc. Див., наприклад, Фігуру 1, Приклади 1-3 і Таблицю 2 (SEQ ID Nos:2 і 4). Див., наприклад, US 7404956, яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

10 [070] Другий поліпептид у гібриді містить або повністю складається з послідовності, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% або 100% ідентичній амінокислотній послідовності, показаній в Таблиці 2B без сигнальної послідовності (амінокислоти з 1 по 227 з SEQ ID NO:4), або альтернативно, з сигнальною послідовністю.

15 [071] Поліпептид даного винаходу також включає Фактор IX, гібридизований з одним або більше XTEN поліпептидами. Schellenburger et al., Nat. Biotech. 27:1186-90 (2009), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. Фактор IX може бути гібридизований або з N-кінцем XTEN поліпептиду, або з C-кінцем XTEN поліпептиду. XTEN поліпептиди включають, але не обмежуючись перерахунком, поліпептиди, розкриті в WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682, і US 2009/0092582, кожна з яких включена в

20 дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

[072] "Інтервал між введенням лікарського засобу" при використанні тут означає кількість часу, яка проходить між введенням повторних доз пацієнту. Інтервал між введенням лікарського засобу в способах винаходу, що використовують хімерний FIX-FcRn BP, наприклад, хімерний FIX-Fc, може бути щонайменше від півтора до восьми раз довше, ніж інтервал між

25 введенням лікарського засобу, необхідний для еквівалентної кількості (у МО/кг) зазначеного Фактора IX без FcRn BP, наприклад, Fc частини (тобто поліпептиду, який складається із зазначеного FIX). Інтервал між введенням лікарського засобу при введенні, наприклад, Фактора IX-Fc хімерного поліпептиду (або гібрида) винаходу може бути щонайменше у півтора раз довше, ніж інтервал між введенням лікарського засобу, необхідний для еквівалентної кількості

30 зазначеного Фактора IX без FcRn BP, наприклад, Fc частини (тобто поліпептиду, що складається із зазначеного Фактора IX). Інтервал між введенням лікарського засобу може бути щонайменше від півтора до восьми раз довше, ніж інтервал між введенням лікарського засобу, необхідний для еквівалентної кількості зазначеного Фактора IX без, наприклад, Fc частини (або поліпептиду, що складається із зазначеного Фактора IX).

35 [073] У деяких варіантах втілення інтервал між введенням лікарського засобу становить 6-18, 6-10, 9-18, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 11, щонайменше 12, щонайменше 13, щонайменше 14, щонайменше 15, щонайменше 16, щонайменше 17 або щонайменше 18 днів. Інтервал між введенням лікарського засобу може становити щонайменше приблизно один раз на тиждень, і може становити 6-10

40 днів, наприклад, приблизно 7-10, приблизно 7-9, приблизно 7-8, приблизно 8-10, приблизно 9-10, приблизно 6-7, приблизно 8-9, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, або приблизно 10 днів.

[074] Інтервал між введенням лікарського засобу може становити 9-18 днів, наприклад, приблизно 9-17, приблизно 9-16, приблизно 9-15, приблизно 9-14, приблизно 9-13, приблизно 9-12, приблизно 9-11, приблизно 9-10 днів, приблизно 10-18, приблизно 11-18, приблизно 12-18, приблизно 13-18, приблизно 14-18, приблизно 15-18, приблизно 16-18, приблизно 17-18 днів, приблизно 10-11, приблизно 11-12, приблизно 12-13, приблизно 13-14, приблизно 14-15, приблизно 15-16, і приблизно 16-17 днів, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13, приблизно 14, приблизно 15, приблизно 16, приблизно 17, або приблизно 18

50 днів. Інтервал між введенням лікарського засобу може становити приблизно 10-14 днів. Інтервал між введенням лікарського засобу може становити приблизно кожні два тижні або двічі на місяць. Інтервал між введенням лікарського засобу може становити більше, ніж 18 днів, наприклад, приблизно 19, приблизно 20, приблизно 21, приблизно 22, приблизно 23, приблизно 24, приблизно 25, приблизно 26, приблизно 27, приблизно 28, приблизно 29, приблизно 30,

55 приблизно 31, приблизно 32, приблизно 33, приблизно 34, приблизно 35, приблизно 36, приблизно 37, приблизно 38, приблизно 39, або приблизно 40 днів. Інтервал між введенням лікарського засобу може бути фіксованим інтервалом, наприклад, 7 днів для 25-50 МО/кг, 10-13 днів для 50-100 МО/кг або 14 днів для 100-150 МО/кг. Фіксований інтервал і доза визначаються так, що комбінація інтервалу і дози буде приводити до мінімального рівня, який становить

60 щонайменше приблизно 1-5 або щонайменше приблизно 1-3, або щонайменше приблизно 1,

щонайменше приблизно 2, або щонайменше приблизно 3 МО/дл FIX активності в популяції пацієнтів або у окремого пацієнта. Фіксований інтервал між введенням лікарського засобу може також становити 7 днів для 20-50 МО/кг, 10-14 днів для 50-100 МО/кг, 14-16 днів для 100-150 МО/кг, 7 днів для 10-50 МО/кг, 10-13 днів для 15-100 МО/кг, або 14-15 днів для 50-150 МО/кг.

5 Фіксований інтервал між введенням лікарського засобу може також становити 7 днів для 10-30 МО/кг, 10 днів для 15-50 МО/кг, 11 днів для 20-70 МО/кг, 12 днів для 25-85 МО/кг, 13 днів для від 30 до 100 МО/кг, 14 днів для від 40 до 125 МО/кг і 15 днів для 50–150 МО/кг.

[075] У кращих варіантах втілення інтервал між введенням лікарського засобу становить 20 МО/кг один раз на тиждень, 40 МО/кг кожні 10 днів або 100 МО/кг кожні два тижні (двічі на місяць).

10 [076] Інтервал між введенням лікарського засобу може, альтернативно, бути індивідуалізованим інтервалом, який визначений для кожного суб'єкта на основі фармакокінетичних даних або іншої інформації про зазначеного суб'єкта. Комбінація індивідуалізованої дози/інтервалу між введенням лікарського засобу може бути такою ж самою, як для фіксованих інтервальних режимів у попередніх параграфах, або може відрізнятися, як проілюстровано в Прикладах. Режим може спочатку бути з фіксованим інтервалом між введенням лікарського засобу, а потім може змінитися на індивідуалізований інтервал між введенням лікарського засобу.

20 [077] "Лікування за вимогою" при використанні тут означає лікування, яке призначено для застосування протягом короткого часу і відповідає існуючому стану, такому як епізод кровотечі, або виявлена короткочасна необхідність, така як плановане хірургічне втручання. Стани, які можуть потребувати лікування за вимогою, включають епізод кровотечі, гемартроз, м'язову кровотечу, ротову кровотечу, геморагію, крововилив у м'яз, ротовий крововилив, травму, травму голови, шлунково-кишкову кровотечу, внутрішньочерепний крововилив, внутрішньочеревний крововилив, внутрішньогрудний крововилив, перелом кістки, кровотечу в центральній нервовій системі, кровотечу в заглотковому просторі, кровотечу в зачеревному просторі або кровотечу в піхву клубово- поперекового м'яза. Інші епізоди кровотечі також включені. Пацієнт може потребувати хірургічної профілактики, периоперативного догляду або підготовки до оперативного втручання. Такі хірургічні операції включають мале хірургічне втручання, велике хірургічне втручання, видалення зуба, тонзилектомію, інші стоматологічні/грудні й лицьові операції, видалення пахової грижі, сіновектомію, повну заміну колінного суглоба, заміну інших суглобів, краніотомію, остеосинтез, травматологічну хірургію, внутрішньочерепні операції, внутрішньочеревні операції, внутрішньогрудні операції. Інші операції також включені. Додаткові стани, які можуть потребувати лікування за вимогою, 35 включають ті, що перераховані в Таблиці 26.

[078] Додаткові стани, які можуть потребувати лікування за вимогою, включають малий крововилив, гемартроз, поверхневий м'язовий крововилив, крововилив у м'які тканини, середній крововилив, внутрішньом'язовий крововилив або крововилив у м'які тканини з розшаруванням, крововилив у слизові, гематурію, сильний крововилив, глотковий крововилив, 40 заглотковий крововилив, ретроперітонеальний крововилив, крововилив у центральній нервовій системі, удари, порізи, подряпини, крововилив у суглоб, носову кровотечу, ротову кровотечу, кровотечу з ясен, внутрішньочерепну кровотечу, внутрішньочеревну кровотечу, малий спонтанний крововилив, кровотечу після серйозної травми, помірний шкірний синець або спонтанний крововилив у суглоби, м'язи, внутрішні органи або в мозок. Додаткові причини для лікування за вимогою включають необхідність у периоперативному догляді при хірургічному втручанні або видаленні зуба, велике хірургічне втручання, великі хірургічні операції в порожнині рота, урологічні операції, операції при грижі, ортопедичні операції, такі як заміна колінного, тазостегнового або будь-якого іншого основного суглоба.

50 [079] Скорочення:

AUC _{INF}	Площа під кривою концентрація-час від нуля нескінченності
AUC _α	Площа під кривою концентрація-час над фазою розподілення
AUC _β	Площа під кривою концентрація-час над фазою виведення
Альфа HL	Півперіод фази розподілення
Бета HL	Півперіод фази виведення; також позначається як $t_{1/2}$
C ₁₆₈	Оцінена FIXFc активність вище базової приблизно через 168 год. після введення дози
C _{max}	Максимальна концентрація, що присутня на T _{max}
CV%	Відсоток коефіцієнта варіації

CI	Кліренс
IVR	in vivo відновлення (%)
K-значення	Поступове відновлення
MRT	Середній час затримання
N	Номер
NC	Не розраховувалось
NR	Не повідомлялось
SD	Стандартне відхилення
SE	Стандартна помилка
TBLP1	Модель-прогнозований час після введення дози, коли FIXFc активність зменшується приблизно до 1 МО/дл вище базового рівня
TBLP3	Модель-прогнозований час після введення дози, коли FIXFc активність зменшується приблизно до 3 МО/дл вище базового рівня
TBLP5	Модель-Прогнозований час після введення дози, коли FIXFc активність зменшується приблизно до 5 МО/дл вище базового рівня
V _{ss}	Об'єм розподілення на стаціонарній фазі
V ₁	Об'єм розподілення в центральному компартменті

[080] Фармакокінетичні (РК) параметри включають вищевказані терміни і наступні терміни, які мають своє звичайне значення в даній галузі техніки, якщо не зазначене інше. Деякі з термінів більш детально пояснюються в Прикладах. РК параметри можуть ґрунтуватися на рівні FIX антигена (часто позначеному в даній заявці в дужках як "антиген") або на рівні FIX активності (часто позначений в даній заявці в дужках як "активність"). У літературі РК параметри часто ґрунтуються на рівні FIX активності через присутність у плазмі деяких пацієнтів ендогенних неактивних FIX, які заважають можливості оцінити введений (тобто екзогенний) FIX, використовуючи антитіло до FIX. Однак коли FIX вводиться як частина гібридного білка, що містить гетерологічний пептид, такий як FcRn BP, то FIX антиген що вводиться (тобто екзогенний) може бути точно виміряний з використанням антитіла до гетерологічного поліпептиду. Крім того, певні РК параметри можуть бути засновані на прогнозованих даних (часто позначуваних у даній заявці в дужках як "модель-прогнозовані") або на спостережуваних даних (часто позначуваних у даній заявці в дужках як "спостережуване"), і переважно засновані на спостережуваних даних.

[081] "Базовий" при використанні тут означає найнижчий підрахований рівень Фактора IX у плазмі крові у пацієнта перед введенням дози. У дослідженні вперше проведеному на людині, описаному в Прикладі 1, рівні Фактора IX у плазмі були підраховані у двох точках часу перед введенням дози: на скринінговому візиті й безпосередньо перед введенням дози. Періоди часу перед введенням дози розглядалися як нуль (базовий рівень) для цілей обчислень, тобто для одержання даних "з відніманням базового рівня". Див., наприклад, Фігуру 4. Альтернативно, (а) базовий рівень у пацієнтів, чия FIX активність перед лікуванням становила <1%, які мають FIX антиген, що не виявляється і мають нонсенс генотипи, визначається як 0%, (б) базовий рівень у пацієнтів з FIX активністю перед лікуванням <1%, які мають FIX антиген що виявляється, установленний на 0,5%, (в) базовий рівень у пацієнтів, чия FIX активність перед лікуванням знаходиться між 1 – 2% являє собою C_{min} (найнижча активність у ході РК дослідження), і (г) базовий рівень у пацієнтів, чия FIX активність перед лікуванням ≥2% становить 2%. Активність вище базового рівня перед введенням дози розглядається як залишкові ліки від попереднього лікування й зводиться до базового рівня й віднімається від даних РК після введення дози rFIXFc. Див. Приклад 11.

[082] "Площа під кривою плазматична концентрація відносно часу" ("AUC"), при використанні тут, ґрунтується на швидкості й протяжності елімінації Фактора IX після введення. AUC визначається за визначений період часу, такий як 12, 18, 24, 36, 48 або 72 годин, або для нескінченності з використанням екстраполяції, заснованої на куті нахилу кривої. Якщо тут не зазначене інше, AUC визначається для нескінченності (AUC_{INF}). AUC також може бути підрахована на основі дози. Як і з багатьма іншими РК параметрами, AUC може бути визначена для одного суб'єкта або для популяції суб'єктів, для яких розраховують середнє значення. У Прикладі 1 середнє значення AUC/доза в популяції пацієнтів становило 32,44 МО*год/дл на МО/кг і діапазон для окремих пацієнтів становив 21,80-54,30 МО*год/дл на МО/кг. (Див. Таблицю 13 для середнього значення AUC/доза, на основі активності.) Отже, середнє значення AUC/доза в популяції пацієнтів може становити приблизно 26-40, приблизно 26, приблизно 27, приблизно 28, приблизно 29, приблизно 30, приблизно 31, приблизно 32,

приблизно 33, приблизно 34, приблизно 35, приблизно 36, приблизно 37, приблизно 38, приблизно 39 або приблизно 40 МО*год./ для МО/кг. Див. Таблицю 14 для значень AUC/доза й інших AUC параметрів, на основі антигена.

[083] "In vivo відновлення" ("IVR") презентовано поступовим відновленням (К-значенням), яке являє собою спостережуваний пік активності мінус рівень перед введенням дози, розділені на дозу. IVR також може бути розраховане на основі відсотків, як описано в Прикладах. Для ясності, у даній заявці використовуються одиниці (К-значення або МО/дл на МО/кг в порівнянні з %). Середнє значення IVR можна визначити в популяції пацієнтів, або можна визначити індивідуальне значення IVR у окремого пацієнта. FIXFc, використане у вперше проведеному на людині дослідженні, описаному в Прикладі 1, продемонструвало середнє значення IVR приблизно 0,93 МО/дл на МО/кг у популяції пацієнтів; і IVR у кожного пацієнта варіювало від 0,62 до 1,17 МО/дл на МО/кг (Таблиця 13). Отже, хімерний поліпептид винаходу демонструє середнє значення IVR у популяції пацієнтів, яке становить 0,85-1,15 (наприклад, приблизно 0,85, приблизно 0,86, приблизно 0,87, приблизно 0,88, приблизно 0,89, приблизно 0,90, приблизно 0,91, приблизно 0,92, приблизно 0,93, приблизно 0,94, приблизно 0,95, приблизно 0,96, приблизно 0,97, приблизно 0,98, приблизно 0,99, приблизно 1,0, приблизно 1,05, приблизно 1,10, приблизно 1,15) і IVR у пацієнта дорівнює щонайменше приблизно 0,6, приблизно 0,7, 0,8, приблизно 0,9, приблизно 1,0, приблизно 1,1, або приблизно 1,2 МО/дл на МО/кг.

[084] "Швидкість кліренсу" ("CL") при використанні тут означає оцінку здатності організму елімінувати ліки, і виражається як об'єм плазми, очищений від ліків, за період часу. FIXFc, використаний у дослідженні, описаному в Прикладі 1, демонстрував середній CL, що становить приблизно 3,36 мл/год/кг (див. Таблицю 13), який приблизно у 2, 5 рази нижче, ніж CL (8,2 мл/год/кг) поліпептиду, що складається з Фактора IX (BENEFIX™); діапазон значень CL у окремих суб'єктів становив 1,84-4,58 мл/год/кг. Отже, хімерний поліпептид винаходу демонструє середній CL у популяції 3,0-3,72, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7 або 3,72 мл/год/кг. Для CL, на основі антигена, див. Таблицю 14.

[085] "Середній час затримання" ("MRT") при використанні тут означає вимірювання середнього часу існування лікарських молекул в організмі. FIXFc, використаний у дослідженні, описаному в Прикладі 1, демонстрував середнє значення MRT приблизно 68,05 годин (див. Таблицю 13); діапазон MRT значень становив 53,1-85,8 годин у окремих пацієнтів. Отже, хімерний поліпептид винаходу демонструє середнє значення MRT у популяції 60-78, приблизно 60, приблизно 62, приблизно 64, приблизно 66, приблизно 68, приблизно 70, приблизно 72, приблизно 74, приблизно 76, або приблизно 78 годин і значення MRT у пацієнта що дорівнює щонайменше приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85, або приблизно 90 годин. Для MRT, на основі антигена, див. Таблицю 14.

[086] " $t_{1/2\beta}$ " або $t_{1/2\beta}$ або "Beta HL," при використанні тут, означає півперіод, пов'язаний з фазою елімінації, $t_{1/2\beta} = (\ln 2) / \text{константа швидкості елімінації}$, пов'язана з термінальною фазою. У дослідженні, описаному в Прикладі 1, використаний FIXFc показував середнє значення $t_{1/2\beta}$ у популяції пацієнтів, яке становило приблизно 52,5 годин (див. Таблицю 13) і діапазон $t_{1/2\beta}$ значень у окремих пацієнтів становив 47-60 годин. Отже, хімерний поліпептид винаходу демонструє середнє значення $t_{1/2\beta}$ більше ніж приблизно 47, приблизно 48, приблизно 49, приблизно 50, приблизно 51, приблизно 52, приблизно 53, приблизно 54, приблизно 55, приблизно 56, приблизно 57, приблизно 58, приблизно 59 або приблизно 60 годин. Для $t_{1/2\beta}$ на основі антигена, див. Таблицю 14.

[087] "Мінімальний рівень" при використанні тут означає найнижчий рівень активності Фактора IX у плазмі, досягнутий після введення дози хімерного поліпептиду винаходу або іншої молекули Фактора IX і до введення наступної дози, якщо воно відбудеться. Термін "мінімальний рівень" у даній заявці використовується взаємозамінно з "граничною величиною". Базові рівні Фактора IX віднімаються з вимірюваних рівнів Фактора IX для розрахунків мінімального рівня. У деяких варіантах втілення мінімальний рівень становить 1-5 або 1-3 МО/дл після приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13 або приблизно 14 днів. У деяких варіантах втілення рівень хімерного поліпептиду в плазмі досягає середнього мінімального рівня, який дорівнює щонайменше приблизно 1 МО/дл після щонайменше приблизно 6 днів у щонайменше приблизно 70%, щонайменше приблизно 80%, щонайменше приблизно 90%, або приблизно 100% популяції пацієнтів, або досягає у пацієнта мінімального рівня, який дорівнює щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, або 5 МО/дл через щонайменше приблизно 6 днів. У деяких варіантах втілення рівень вищезгаданого хімерного поліпептиду в плазмі досягає середнього мінімального рівня, який

дорівнює приблизно 1-5 або 1-3 МО/дл. Такий мінімальний рівень або середній мінімальний рівень може бути досягнутий через приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13, приблизно 14, приблизно 15, приблизно 16, приблизно 17, приблизно 18, приблизно 19, приблизно 20, приблизно 21, приблизно 22, приблизно 23, приблизно 24, приблизно 25, приблизно 26, приблизно 27, приблизно 28, приблизно 29, приблизно 30, приблизно 31, приблизно 32, приблизно 33, приблизно 34, приблизно 35, приблизно 36, приблизно 37, приблизно 38, приблизно 39, або приблизно 40 днів.

[088] "Об'єм розподілення у стаціонарній фазі (Vss)" при використанні тут означає видимий простір (об'єм), у якому розподіляється лікарський засіб. Vss = кількість ліків у організмі розділена на концентрацію в плазмі у стаціонарній фазі. У Прикладі 1 середній Vss, виявлений у популяції, становив приблизно 226 мл/кг, і діапазон у пацієнтів становив приблизно 145-365 мл/кг. (Див. Таблицю 13.) Таким чином, середнє значення Vss у популяції пацієнтів може становити 200-300, приблизно 200, приблизно 210, приблизно 220, приблизно 230, приблизно 240, приблизно 250, приблизно 260, приблизно 270, приблизно 280, приблизно 290 або приблизно 300 мл/кг. Рівень Vss у окремих пацієнтів може становити приблизно 145, приблизно 150, приблизно 160, приблизно 170, приблизно 180, приблизно 190, приблизно 200, приблизно 210, приблизно 220, приблизно 230, приблизно 240, приблизно 250, приблизно 260, приблизно 270, приблизно 280, приблизно 290, приблизно 300, приблизно 310, приблизно 320, приблизно 330, приблизно 340, приблизно 350, приблизно 360 або приблизно 370 мл/кг. Рівні Vss на основі антигену, див. у Таблиці 14.

[089] Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються як взаємозамінні й відносяться до полімерної сполуки, що містить ковалентно зв'язані амінокислотні залишки.

[090] Терміни "полінуклеотид" і "нуклеїнова кислота" використовуються як взаємозамінні й відносяться до полімерної сполуки, яка містить ковалентно зв'язані нуклеотидні залишки. Полінуклеотиди можуть бути ДНК, кДНК, РНК, одноланцюговими або дволанцюговими, векторами, плазмідами, фагами або вірусами. Полінуклеотиди включають зазначені в Таблиці 1, які кодують поліпептиди Таблиці 2 (див. Таблицю 1). Полінуклеотиди також включають фрагменти полінуклеотидів Таблиці 1, наприклад, ті, які кодують фрагменти поліпептидів з Таблиці 2, такі як Фактор IX, Fc, сигнальну послідовність, пропептид, 6His і інші фрагменти поліпептидів Таблиці 2.

[091] "Профілактичне лікування" при використанні тут означає введення Фактора IX поліпептиду в багаторазових дозах пацієнту протягом періоду часу для підвищення рівня активності Фактора IX у плазмі крові пацієнта. Краще, підвищений рівень є достатнім для зниження частоти випадків спонтанної кровотечі або для запобігання кровотечі у випадку несподіваної травми. Профілактичне лікування зменшує кількість епізодів кровотечі або запобігає їм, наприклад, тим, які описані нижче при лікуванні за вимогою. Профілактичне лікування може бути фіксованим або може бути індивідуалізованим, як обговорюється нижче в роздвіл "інтервал між введенням дози", наприклад, для компенсації варіабельності між пацієнтами.

[092] "Суб'єкт" при використанні тут означає людину або ссавця, що не є людиною. Ссавці, що не є людиною, включають мишей, собак, приматів, мавп, кішок, коней, корів, свиней і інших свійських тварин і дрібних тварин. Суб'єкти також включають педіатричних пацієнтів, що є людьми. Педіатричні пацієнти є людьми у віці до 20 років, переважно до 18 років, до 16 років, до 15 років, до 12 років, до 11 років, до 6 років, до 5 років, до 2 років, і від 2 до 11 років.

[093] Способи винаходу можуть практикуватися на суб'єкті, який потребує контролю або запобігання кровотечі або епізодів кровотечі. Такі суб'єкти включають тих, які потребують контролю або запобігання кровотечі при незначному крововиливі, гемартрозі, поверхневому м'язовому крововиливі, середньому крововиливі, внутрішньому м'язовому крововиливі або крововиливі в м'які тканини з розшаруванням, крововиливі в слизові, гематурії, сильному крововиливі, глотковому крововиливі, заглотковому крововиливі, зачеревному крововиливі, крововиливі в центральній нервовій системі, ударах, порізах, подряпинах, суглобному крововиливі, носовій кровотечі, ротовій кровотечі, кровотечі з ясен, внутрішньочерепній кровотечі, внутрішньочеревній кровотечі, малому спонтанному крововиливі, кровотечі після серйозної травми, помірного синці шкіри або спонтанному крововиливі в суглоби, м'язи, внутрішні органи або в мозок. Такі пацієнти також включають тих, які потребують периоперативного догляду, такого як контроль кровотечі, пов'язаної з хірургічною операцією або видаленням зуба.

[094] "Терапевтична доза" при використанні тут означає дозу, за допомогою якої досягається терапевтична мета, як описано тут. Розрахунки необхідної дози одержаного із плазми крові

Фактора IX (pdFIX) ґрунтуються на емпіричних спостереженнях, що, у середньому 1 МО pdFIX на кг маси тіла підвищує активність плазматичного Фактора IX приблизно на 1 МО/дл (1%). На цій основі визначають необхідну дозу, використовуючи наступну формулу:

Необхідні одиниці = маса тіла (кг) x бажане підвищення Фактора IX (МО/дл або % від норми) x 1 (МО/кг на МО/дл)

[095] Оскільки FIXFc, наприклад, як описано в Прикладах і на Фігурі 1, має таке саме поступове відновлення як і pdFIX (одмінне від такого у BENEFIX™), необхідна доза визначається за наведеною вище формулою, або трохи регулюється. Див. також у Таблиці 26 особливі рекомендовані дози для різних варіантів лікування на вимогу. Для педіатричних пацієнтів, які застосовують pdFIX, керівництво з дозування є таким самим, як і для дорослих. Однак педіатричні пацієнти можуть мати нижчий рівень поступового відновлення, а отже може виникнути необхідність регулювання дози в сторону збільшення.

[096] Терапевтичні дози, які можуть бути застосовані в способах винаходу, становлять 10-180, 20-180 або 25-180 МО/кг, більш конкретно, кращі дози, для 6-10 денного інтервалу між введенням лікарського засобу є наступними: приблизно 25-110, приблизно 30-110, приблизно 40-110, приблизно 50-110, приблизно 60-110, приблизно 70-110, приблизно 80-110, приблизно 90-110 і приблизно 100-110; приблизно 30-100, приблизно 30-90, приблизно 30-80, приблизно 30-70, приблизно 30-60, приблизно 30-50, приблизно 30-40 МО/кг; приблизно 40-110, приблизно 50-100, приблизно 60-90 і приблизно 70-80 МО/кг; приблизно 40-50, приблизно 50-60, приблизно 60-70, приблизно 70-80, приблизно 80-90, приблизно 90-100 і приблизно 100-110 МО/кг; приблизно 25, приблизно 30, приблизно 35, приблизно 40, приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85, приблизно 90, приблизно 95, приблизно 100, приблизно 105 і приблизно 110 МО/кг. 6-10 денний інтервал між введенням лікарського засобу включає тижневий інтервал між введенням лікарського засобу. Додаткові терапевтичні дози для 6-10 денного, наприклад, тижневого інтервалу між введенням лікарського засобу, становлять 20-50, 20-100 і 20-180 МО/кг, більш конкретно, кращі дози для 6-10 денного, наприклад, тижневого інтервалу між введенням лікарського засобу є наступними: приблизно 20-110, приблизно 20-100, приблизно 20-90, приблизно 20-80, приблизно 20-70, приблизно 20-60, приблизно 20-50, приблизно 20-40, приблизно 20-30, приблизно 20-40 і приблизно 20 кг/кг. Див. також Приклади 10 і 11. Дози можуть бути нижчими за 20 МО/кг, якщо вони є ефективними для даного пацієнта, наприклад, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13, приблизно 14, приблизно 15, приблизно 16, приблизно 17, приблизно 18 або приблизно 19 МО/кг.

[097] Кращі терапевтичні дози, для 9-18 денного інтервалу між введенням лікарського засобу, наприклад, для введення двічі на місяць є наступними: приблизно 50-180, приблизно 60-180, приблизно 70-180, приблизно 80-180, приблизно 90-180, приблизно 100-180, приблизно 110-180, приблизно 120-180, приблизно 130-180, приблизно 140-180, приблизно 150-180, приблизно 160-180 і приблизно 170-180 МО/кг; приблизно 90-170, приблизно 90-160, приблизно 90-150, приблизно 90-140, приблизно 90-130, приблизно 90-120, приблизно 90-110 і приблизно 90-100 МО/кг; приблизно 100-170, приблизно 110-160, приблизно 120-150, і приблизно 130-140 МО/кг; приблизно 90-100, приблизно 100-110, приблизно 110-120, приблизно 120-130, приблизно 130-140, приблизно 140-150, приблизно 150-160 і приблизно 160-170 МО/кг; приблизно 60, приблизно 70, приблизно 80, приблизно 90, приблизно 95, приблизно 100, приблизно 105, приблизно 110, приблизно 115, приблизно 120, приблизно 125, приблизно 130, приблизно 135, приблизно 140, приблизно 145, приблизно 150, приблизно 155, приблизно 160, приблизно 165, приблизно 170, приблизно 175 і приблизно 180 МО/кг. Див. також Приклади 10 і 11.

[098] Кращі терапевтичні дози становлять 10-50, 15-100, 20-100, 20-50, 50-100, 10, 20, 40, 50 і 100 МО/кг.

[099] Терапевтична доза може становити приблизно 20-50, приблизно 20-100, приблизно 20-180, 25-110, приблизно 30-110, приблизно 40-110, приблизно 50-110, приблизно 60-110, приблизно 70-110, приблизно 80-110, приблизно 90-110, приблизно 100-110, приблизно 30-100, приблизно 30-90, приблизно 30-80, приблизно 30-70, приблизно 30-60, приблизно 30-50, приблизно 30-40 МО/кг, приблизно 40-110, приблизно 50-100, приблизно 60-90, приблизно 70-80 МО/кг, приблизно 40-50, приблизно 50-60, приблизно 60-70, приблизно 70-80, приблизно 80-90, приблизно 90-100, приблизно 100-110 МО/кг, приблизно 20, приблизно 25, приблизно 30, приблизно 35, приблизно 40, приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85, приблизно 90, приблизно 95, приблизно 100, приблизно 105 і приблизно 110 МО/кг. Такі дози кращі для інтервалів між введенням дози, які дорівнюють приблизно 6-10, приблизно 7-10, приблизно 7-9,

приблизно 7-8, приблизно 8-10, приблизно 9-10, приблизно 6-7, приблизно 8-9, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9 і приблизно 10 днів, і один раз на тиждень.

[0100] Терапевтична доза може становити приблизно 90-180, приблизно 100-180, приблизно 110-180, приблизно 120-180, приблизно 130-180, приблизно 140-180, приблизно 150-180, 5 приблизно 160-180 і приблизно 170-180 МО/кг. Доза може становити приблизно 90-170, приблизно 90-160, приблизно 90-150, приблизно 90-140, приблизно 90-130, приблизно 90-120, приблизно 90-110 і приблизно 90-100 МО/кг. Доза може становити приблизно 100-170, приблизно 110-160, приблизно 120-150 і приблизно 130-140 МО/кг. Доза може становити 10 приблизно 90-100, приблизно 100-110, приблизно 110-120, приблизно 120-130, приблизно 130-140, приблизно 140-150, приблизно 150-160 і приблизно 160-170 МО/кг. Доза може становити приблизно 90, приблизно 95, приблизно 100, приблизно 105, приблизно 110, приблизно 115, приблизно 120, приблизно 125, приблизно 130, приблизно 135, приблизно 140, приблизно 145, приблизно 150, приблизно 155, приблизно 160, приблизно 165, приблизно 170, приблизно 175 і 15 приблизно 180 МО/кг. Такі дози є кращими для інтервалу між введенням лікарського засобу, який дорівнює приблизно 9-18, приблизно 9-17, приблизно 9-16, приблизно 9-15, приблизно 9-14, приблизно 9-13, приблизно 9-12, приблизно 9-11, приблизно 9-10, приблизно 10-18, приблизно 11-18, приблизно 12-18, приблизно 13-18, приблизно 14-18, приблизно 15-18, приблизно 16-18, приблизно 17-18, приблизно 10-11, приблизно 11-12, приблизно 12-13, 20 приблизно 13-14, приблизно 14-15, приблизно 15-16 і приблизно 16-17 днів, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13, приблизно 14, приблизно 15, приблизно 16, приблизно 17 і приблизно 18 днів, один раз на місяць і двічі на місяць (кожні два тижні).

[0101] Краща терапевтична доза і інтервали між введенням лікарського засобу є наступними: 20 МО/кг один раз на тиждень, 40 МО/кг кожні 10 днів, і 100 МО/кг кожні два тижні 25 (двічі на місяць). Додаткові комбінації дози і інтервалу між введенням дози включають: дозу щонайменше приблизно 50 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу щонайменше приблизно 7 днів, дозу щонайменше приблизно 100 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу щонайменше приблизно 9 днів, дозу щонайменше приблизно 100 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу щонайменше приблизно 12 днів, дозу щонайменше приблизно 150 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу щонайменше приблизно 14 днів, дозу 30 20-50 або 20-100 МО/кг і зазначений інтервал між введенням лікарського засобу являє собою один раз на тиждень, дозу 20-50 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу 7 днів, дозу 50-100 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу 10-14 днів, або дозу 100-150 МО/кг і інтервал між введенням лікарського засобу 14-16 днів. Кращі комбінації інтервалу між 35 введенням лікарського засобу і дози також включають 10-50 МО/кг для 7 днів, 15-100 МО/кг для 10-13 днів, 50-150 МО/кг для 14-15 днів, 10-30 МО/кг для 7 днів, 15-50 МО/кг для 10 днів, 20-70 МО/кг для 11 днів, 25-85 МО/кг для 12 днів, від 30 до 100 МО/кг для 13 днів, від 40 до 125 МО/кг для 14 днів, і 50-150 МО/кг для 15 днів.

[0102] "Варіант" при використанні тут означає полінуклеотид або поліпептид, відмінний від 40 вихідного полінуклеотиду або поліпептиду, але такий, що зберігає його основні властивості, наприклад коагулюючу активність Фактора IX або Fc (FcRn-зв'язувальну) активність. Звичайно варіанти в цілому подібні, а на багатьох ділянках ідентичні вихідним полінуклеотидам або поліпептидам. Варіанти включають фрагменти полінуклеотидів і поліпептидів, делеції, вставки і модифіковані версії вихідних поліпептидів.

[0103] Варіантні полінуклеотиди можуть містити або ж, альтернативно, складатися з 45 послідовності нуклеотидів, щонайменше на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичної, наприклад, кодуєчій послідовності нуклеотидів в SEQ ID NO:1 або 3 (ділянка Фактора IX, ділянка Fc, окремо або разом) або відповідного їй комплементарного ланцюга, послідовності нуклеотидів, що кодує відомі мутантні й рекомбінантні Фактор IX або Fc, як ті, що 50 розкриті в процитованих тут публікаціях і патентах, або у відповідному їй комплементарному ланцюзі, послідовності нуклеотидів, що кодує поліпептид SEQ ID NO:2 або 4 (ділянка Фактора IX, ділянка Fc, окремо або разом), і/або полінуклеотидним фрагментам будь-якої з цих нуклеїнових кислот (наприклад, їх фрагментам, описаним тут). Полінуклеотиди, які гібридизуються із цими молекулами нуклеїнових кислот за точних умов гібридизації або за менш 55 точних умов, також включаються як варіанти, так само як і поліпептиди, які кодуються цими полінуклеотидами у випадку їх функціональності.

[0104] Варіантні поліпептиди можуть містити, або, альтернативно, складатися з послідовності амінокислот, яка є щонайменше на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичною, наприклад, послідовності поліпептидів, показаних в SEQ ID NO:2 або 4 (ділянка 60 Фактора IX, ділянка Fc, окремо або разом), і/або поліпептидним фрагментам будь-якого із цих

поліпептидів (наприклад, описаним тут фрагментам).

[0105] Під нуклеиновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, наприклад, щонайменше на 95%, "ідентичну" еталонній послідовності нуклеотидів мають на увазі, що послідовність нуклеотидів у нуклеинової кислоти є ідентичною еталонній послідовності, за тим виключенням, що ця послідовність нуклеотидів може включати до п'яти точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів еталонної послідовності нуклеотидів. Інакше кажучи, щоб одержати нуклеїнову кислоту, що містить послідовність нуклеотидів, щонайменше на 95% ідентичну еталонній послідовності нуклеотидів, до 5% нуклеотидів в еталонній послідовності можуть бути видалені або заміщені іншими нуклеотидами, або нуклеотиди в кількості до 5% від загального числа нуклеотидів в еталонній послідовності можуть бути вставлені в еталонну послідовність. Запитуваною послідовністю може бути, наприклад, ціла послідовність, показана в SEQ ID NO:1 або 3, ORF (відкрита рамка зчитування) або будь-який фрагмент, визначений як описано тут.

[0106] На практиці, чи є будь-яка конкретна молекула нуклеинової кислоти або поліпептиду щонайменше на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичною послідовності нуклеотидів або поліпептиду даного винаходу, можна встановити конвенціональним шляхом з використанням відомих комп'ютерних програм. Кращий спосіб установлення кращого загального збігу між запитуваною послідовністю (еталонною або вихідною послідовністю) і досліджуваною послідовністю, також відомий як глобальне вирівнювання послідовностей, може бути обраний за допомогою комп'ютерної програми FASTDB, на основі алгоритму Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245), що включений в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. У вирівнюванні послідовностей, як запитувана, так і досліджувана послідовності є послідовностями ДНК. Послідовність РНК можна порівняти шляхом конвертації U в T. Результат вищезазначеного глобального вирівнювання послідовностей дається в процентному співвідношенні. Кращі параметри, застосовувані у вирівнюванні послідовностей ДНК за допомогою FASTDB для обчислення процентного співвідношення: Матриця=Одинична, k-кратний=4, Поправковий коефіцієнт за неузгодження=1, Поправковий коефіцієнт за зшивання = 30, Довжина групи рандомізації=0, Поріг=1, Поправковий коефіцієнт за геп = 5, Поправковий коефіцієнт розміру гепа 0,05, Розмір вікна = 500 або довжині досліджуваної послідовності нуклеотидів, якщо вона є коротшою.

[0107] Якщо досліджувана послідовність коротше запитуваної послідовності внаслідок делецій 5' або 3', але не внаслідок внутрішніх делецій, результати необхідно коректувати вручну. Це тому, що програма FASTDB не враховує усікання 5' і 3' досліджуваної послідовності при обчисленні процентного співвідношення. Для досліджуваних послідовностей, усічених на закінченнях 5' або 3' відносно запитуваної послідовності, процентне співвідношення коректується шляхом обчислення кількості основ у запитуваній послідовності, які є 5' і 3' у досліджуваній послідовності, і які не збігаються / вирівняні, у відсотках від загального числа основ у запитуваній послідовності. Чи збігається / вирівняний нуклеотид, визначають за результатами FASTDB вирівнювання послідовностей. Цей відсоток потім віднімається із процентного співвідношення, обчисленого вищезгаданою програмою FASTDB з використанням установлених параметрів, для одержання підсумкового значення процентного співвідношення. Це відкоректоване значення і використовується для цілей даного винаходу. Тільки основи, розташовані за межами основ 5' і 3' досліджуваної послідовності, згідно з показаннями вирівнювання FASTDB, які не збігаються / вирівняні із запитуваною послідовністю, враховуються з метою ручного виправлення значення процентного співвідношення.

[0108] Наприклад, досліджувана послідовність із 90 основ вирівняна із запитуваною послідовністю з 100 основ для визначення процентного співвідношення. Делеції присутні на закінченні 5' досліджуваної послідовності, і отже, вирівнювання FASTDB не демонструє збігу / вирівнювання перших 10 основ на закінченні 5'. Ці 10 непарних основ являють собою 10% послідовностей (кількість основ, що не співпали, на закінченнях 5' і 3' / загальна кількість основ у в запитуваній послідовності), отже, 10% віднімаються зі значення процентного співвідношення, обчисленого за допомогою програми FASTDB. Якщо інші 90 основ збігаються ідеально, підсумкове процентне співвідношення буде становити 90%. В іншому прикладі досліджувана послідовність із 90 основ порівнюється із запитуваною послідовністю з 100 основ. Цього разу делеції є внутрішніми делеціями, так що відсутні основи на 5' або 3' досліджуваній послідовності, які не збігаються / вирівняні із запитуваною. У такому випадку, процентне співвідношення, обчислене за допомогою FASTDB, вручну не коректується. Тільки для основ 5' і 3' досліджуваної послідовності, які не збігаються / вирівняні із запитуваною послідовністю, виконується ручна корекція. Ніякі інші ручні корекції не потрібні для цілей даного винаходу.

[0109] Під поліпептидом, що містить послідовність амінокислот, "ідентичну" запитуваній

послідовності амінокислот даного винаходу щонайменше, наприклад, на 95%, мається на увазі, що послідовність амінокислот досліджуваного поліпептиду ідентична запитуваній послідовності, за тим виключенням, що досліджувана послідовність поліпептидів може включати до п'яти змін амінокислот на кожні 100 амінокислот запитуваної послідовності амінокислот. Інакше кажучи, щоб одержати поліпептид, що містить послідовність амінокислот, щонайменше на 95% ідентичну запитуваній послідовності амінокислот, до 5% амінокислотних залишків у досліджуваній послідовності можуть бути вставлені, видалені або замінені іншими амінокислотами. Такі зміни в еталонній послідовності можуть бути присутнім на аміно- або карбокси-термінальних позиціях еталонної послідовності амінокислот або де завгодно між цими термінальними позиціями, поодинокі серед залишків в еталонній послідовності або у вигляді однієї або більше злитих груп у межах еталонної послідовності.

[0110] На практиці, чи є будь-який конкретний поліпептид щонайменше на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичним, наприклад, послідовності амінокислот в SEQ ID NO:2 (ділянка Фактора IX, ділянка Fc, окремо або разом) або 4, або відомій поліпептидній послідовності Фактора IX або Fc, можна встановити конвенціональним шляхом з використанням відомих комп'ютерних програм. Кращий спосіб встановлення кращого загального збігу між запитуваною послідовністю (еталонною або початковою послідовністю) і досліджуваною послідовністю, також відомий як глобальне вирівнювання послідовностей, може бути обраний за допомогою комп'ютерної програми FASTDB, заснованої на алгоритмі Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. У вирівнюванні послідовностей як запитувана, так і досліджувана послідовності є послідовностями нуклеотидів, або як запитувана, так і досліджувана послідовності є послідовностями амінокислот. Результат вищезазначеного глобального вирівнювання послідовностей дається в процентному співвідношенні. Кращі параметри, застосовувані у вирівнюванні амінокислот за допомогою FASTDB для обчислення процентного співвідношення: Матриця=PAM 0, k-кратний=2, Поправковий коефіцієнт за неузгодження =1, Поправковий коефіцієнт за зшивання = 20, Довжина групи рандомізації=0, Поріг=1, Розмір вікна=довжина послідовності, Поправковий коефіцієнт за геп = 5, Поправковий коефіцієнт розміру гепа 0,05, Розмір вікна = 500 або довжині досліджуваної послідовності нуклеотидів, якщо вона є коротшою.

[0111] Якщо досліджувана послідовність коротше запитуваної послідовності внаслідок N- або C-кінцевих делецій, але не внаслідок внутрішніх делецій, результати повинні бути відкоректовані вручну. Це тому, що програма FASTDB не враховує N- і C-кінцеві усікання досліджуваної послідовності при обчисленні підсумкового процентного співвідношення. Для досліджуваних послідовностей, усічених на N- і C-кінцях відносно запитуваної послідовності, процентне співвідношення коректується шляхом обчислення кількості залишків у запитуваній послідовності, які є N- і C-кінцевими в досліджуваній послідовності, і які не збігаються / вирівняні з відповідними досліджуваними залишками, у відсотках від загального числа основ у запитуваній послідовності. Чи збігається / вирівняний залишок, визначається за результатами вирівнювання послідовностей FASTDB. Цей відсоток потім віднімається із процентного співвідношення, обчисленого вищезгаданою програмою FASTDB з використанням установлених параметрів, для одержання підсумкового значення процентного співвідношення. Це відкоректоване значення і використовується для цілей даного винаходу. Тільки залишки на N- і C-кінцях досліджуваної послідовності, які не збігаються/вирівняні із запитуваною послідовністю, враховуються з метою ручного виправлення значення процентного співвідношення. Іншими словами, тільки позиції залишків у запитуваній послідовності, розташовані за межами найбільш віддалених N- і C-термінальних залишків досліджуваної послідовності.

[0112] Наприклад, досліджувана послідовність із 90 амінокислотних залишків вирівняна із запитуваною послідовністю з 100 амінокислотних залишків для визначення процентного співвідношення. Делеції присутні на N-кінці досліджуваної послідовності, і отже, вирівнювання FASTDB не демонструє збігу/вирівнювання перших 10 залишків на N-кінці. Ці 10 непарних залишків являють собою 10% послідовності (число залишків, що не збіглися, на N- і C-кінцях / загальне число залишків у запитуваній послідовності), отже, 10% віднімаються від значення процентного співвідношення, обчисленого програмою FASTDB. Якщо інші 90 залишків збігаються ідеально, підсумкове процентне співвідношення буде 90%. В іншому прикладі, досліджувана послідовність із 90 залишків порівнюється із запитуваною послідовністю з 100 залишків. Цього разу делеції є внутрішніми делеціями, тому на N- і C-кінцях досліджуваної послідовності відсутні основи, які не збігаються / вирівняні із запитуваною послідовністю. У такому випадку, процентне співвідношення, обчислене за допомогою програми FASTDB, вручну не коректується. Тільки для позицій залишків, розташованих за межами N- і C-кінців

досліджуваної послідовності, згідно з показаннями вирівнювання FASTDB, які не збігаються / вирівняні із запитуваною послідовністю, виконується ручна корекція. Ніякі інші ручні корекції для цілей даного винаходу не потрібні.

[0113] Варіанти полінуклеотиду можуть містити зміни у кодуєчих ділянках, некодуєчих ділянках, або в обох. Найбільш кращі варіанти полінуклеотиду, що містять зміни, які створюють мовчазні заміни, вставки або делеції, але не змінюють властивості й активність поліпептиду, що кодується. Кращими варіантами нуклеотиду є створені за допомогою мовчазної заміни внаслідок дегенерації генетичного коду. Крім того, кращими варіантами також є ті, у яких 5-10, 1-5, або 1-2 амінокислоти замінені, видалені або вставлені в будь-якій комбінації. Варіанти полінуклеотиду можуть бути створені з різною метою, наприклад, для оптимізації експресії кодонів для конкретного хазяїна (заміна кодонів в людській іРНК на кращі для бактеріального хазяїна, такого як *E. coli*).

[0114] Природні варіанти називаються "алельні варіанти" і відносяться до однієї з декількох різних форм гена, що займають даний локус на хромосомі організму (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Ці алельні варіанти можуть різнитися на рівні полінуклеотидів і/або на рівні поліпептидів і включаються в даний винахід. Альтернативно, неприродні варіанти можуть бути одержані за допомогою способів мутагенезу або шляхом прямого синтезу.

[0115] Використовуючи відомі способи білкової інженерії і технології рекомбінантної ДНК, можна створювати варіанти з метою покращення або зміни характеристики поліпептидів. Наприклад, одна або більше амінокислот можуть бути видалені з N-кінця або C-кінця виділеного білка без значних втрат у біологічній функції. Автори роботи Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання, відзначали, що варіанти білка KGF зберігали гепарин-зв'язувальну активність навіть після видалення 3, 8, або 27 амінотермінальних амінокислотних залишків. Подібним же чином, гама інтерферон демонстрував підвищену до 10 раз активність після видалення 8-10 амінокислотних залишків з карбокси-кінця цього білка. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988), включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.)

[0116] Більше того, існує достатня кількість даних, які демонструють, що варіанти нерідко зберігають біологічну активність, подібну до активності природного білка. Наприклад, Gayle і співробітники в роботі (J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання) провели розширений мутаційний аналіз людського цитокіну IL-1a. Вони використовували випадковий мутагенез для генерації більше 3500 незалежних мутантів IL-1a, які в середньому містили по 2,5 зміни амінокислот на варіант по всій довжині молекули. Множинні мутації були розглянуті на кожній з можливих амінокислотних позицій. Дослідники виявили, що «більша частина молекули може бути змінена без особливого впливу на зв'язувальну або біологічну активність» (Див. розділ Реферат) Фактично, тільки 23 унікальні послідовності амінокислот з більш ніж 3500 досліджених послідовностей нуклеотидів продукували білок, який значно відрізнявся за своєю активністю від дикого типу.

[0117] Як зазначено вище, варіанти поліпептидів включають модифіковані поліпептиди. Модифікації включають ацетилювання, ацилювання, АДФ-рибозилування, амідування, ковалентне приєднання флавіну, ковалентне приєднання гемової групи, ковалентне приєднання нуклеотиду або похідного нуклеотиду, ковалентне приєднання ліпиду або похідного ліпиду, ковалентне приєднання фосфотидилінозиту, перехресне зшивання, циклізацію, формування дисульфідних зв'язків, деметилювання, формування ковалентних зшивок, формування цистеїну, формування піроглутамату, формілювання, гама- карбоксилювання, глікозилювання, формування глікозилфосфатидилінозиту, гідроксилювання, йодування, метилювання, міристилювання, окиснення, пегілювання, протеолітичний процесінг, фосфорилування, пренілювання, рацемізацію, селеноїлювання, сульфатування, tРНК-опосередкована вставка амінокислот у білки, як аргинілювання, і убіквітинування.

[0118] Термін "приблизно" застосовується тут у значенні «приблизно», «округленно», «близько» або «у районі». Коли термін "приблизно" використовується в комбінації з областю числових значень, він модифікує цю область шляхом розширення її меж вище й нижче зазначених числових значень. У цілому, термін "приблизно" використовується тут для модифікації числового значення на величину в 10%, як угору, так і вниз (більше або менше).

[0119] Тепер, коли ми детально описали даний винахід, те ж саме можна повніше зрозуміти за допомогою подсилання до нижченаведених прикладів, які включені сюди тільки з метою ілюстрації і не обмежують даний винахід. Всі наведені тут патенти і публікації включені повністю за допомогою посилання.

Приклад 1 Дослідження, вперше поставлене на людині (FiH від англ. first-in-human)

[0120] Дослідження, вперше поставлене на людині, було відкритим, з ескалацією дози, Фаза 1/2 дослідженням для визначення безпечності, переносності й фармакокінетичних (РК) параметрів FIXFc (рекомбінантний гібридний білок людського фактора IX коагуляції). FIXFc являє собою рекомбінантний гібридний білок, що містить людський фактор IX згортання, з'єднаний з Fc доменом з людського IgG1. Гібридний білок експресується в людських ембріональних ниркових клітинах (НЕК 293). Див. Приклад 3.

[0121] FIXFc розроблений для контролю й запобігання випадків крововиливу у пацієнтів з гемофілією В (врожений дефіцит фактора IX або хвороба Кристмаса), включаючи контроль і запобігання кровотечі при хірургічних втручаннях.

[0122] FIXFc являє собою рекомбінантний гібридний білок, що містить Фактор IX (FIX) коагуляції і Fc домен людського антитіла (IgG1 ізотип). Молекула FIXFc являє собою гетеродимер з одним ланцюгом FIXFc (FIXFc-sc) і одним ланцюгом Fc (Fc-sc), зв'язаними разом за допомогою двох дисульфідних зв'язків у петльовій ділянці Fc. Див. Фігуру 1 і Таблицю 2.

[0123] Лікарський продукт rFIXFc являє собою прозорий безбарвний розчин, призначений для внутрішньовенного (ВВ) введення. Продукт rFIXFc поставляється в ампулах для одноразового використання об'ємом 10 мл в дозі 1000 МО на об'єм 5 мл. Лікарський продукт упаковується в скляні ампули типу I USP із бромбутиловими пробками і відривними простими алюмінієвими додатковими закупорювальними засобами. Лікарський продукт rFIXFc містить 200 МО/мл в 10 мМ натрій-фосфатному буфері рН 7,0 з додаванням 145 мМ NaCl і 0,1% полісорбату 20. Розчин rFIXFc не слід робавляти.

[0124] Дизайн дослідження. Раніше проліковані пацієнти з важкою гемофілією В, загальною кількістю 14 людей, були включені в дослідження і проліковані FIXFc шляхом внутрішньовенної (ВВ) інфузії протягом приблизно 10 хвилин. У дослідженні оцінювались шість дозових рівнів, 1; 5; 12,5; 25; 50 і 100 МО/кг. Один пацієнт на дозовий рівень був включений у дослідження дозових рівнів 1; 5; 12,5 і 25 МО/кг, і щонайменше три пацієнта, що підлягають оцінюванню були включені в дослідження дозового рівня 50 і 100 МО/кг.

[0125] Після скринінгу (призначеного протягом 14 днів FIXFc дози) почався період лікування пацієнтів. Період лікування для кожного дозового рівня включав одну дозу FIXFc (День 1) до завершення 72-годинного періоду спостереження безпечності (3 дня) для дозових рівнів 1 і 5 МО/кг або до моменту відбору останньої проби РК для пацієнтів у випадку дозових рівнів від 12,5 до 100 МО/кг (приблизно 10 днів). Пацієнти, проліковані дозами 1; 5; 12,5 або 25 МО/кг були включені в дослідження і проліковані послідовним способом, починаючи з дози 1 МО/кг. Пацієнти, які одержували дозу 50 МО/кг, не одержували більше лікування в той же день, і щонайменше один день розділяв введення дози. Після лікування пацієнтів дозою 50 МО/кг, починалось лікування пацієнтів дозою 100 МО/кг.

[0126] Період після лікування являв собою 30-денний період спостереження за безпечністю, який починався від дня, коли пацієнт одержував дозу FIXFc, і частково збігався з періодом лікування з того моменту, коли пацієнти проходили необхідне для дослідження оцінювання, таке як відбір проб для РК, протягом цього періоду часу.

[0127] У пацієнтів, яким були призначені дозові рівні від 12,5 до 100 МО/кг, відбирали зразки крові для оцінювання FIX активності й FIXFc концентрації. Зразки крові відбирали безпосередньо перед введенням FIXFc; через 15 хвилин після закінчення інфузії; і через 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96, 120, 168 і 240 годин після закінчення інфузії або доти, доки досягались базові рівні FIX. Якщо у пацієнта продовжували спостерігати рівні FIX вище базового в часовій точці 240-годин (День дослідження 11), зразки брали через 288 годин (День дослідження 13) і знову через 336 годин (День дослідження 15), якщо рівень FIX був вище базового на День 13 Дослідження.

[0128] Пацієнт 10 одержав BENEFIX™ лікування кровотечі перед призначеним відбором FIXFc зразка через 216 годин після введення дози. Отже, FIXFc активність і дані щодо антигена через 216 год. і в наступних точках часу були виключені з аналізу. Не відбулося додаткових відхилень, які, як вважається, могли би вплинути на попередні результати аналізу в ланому дослідженні.

[0129] Для антигена Фактора IX фармакокінетичні аналізи були проведені для спостережуваної концентрації FIXFc проти часових даних після ВВ інфузії FIXFc окремому пацієнту. Первинний аналіз був проведений з використанням модель-залежної методології. Дані концентрації FIXFc були оброблені комп'ютером для двокомпартментної відкритої моделі з елімінацією із центрального компартмента з використанням визначених користувачем оцінок первинного параметра для розрахунків значень вихідного параметра. Були сгенеровані WinNonlin оцінені константи мікроскопічного ступеня й дані і концентрації FIXFc були оцінені за допомогою функції $1/(Y^{\text{hat}} * Y^{\text{hat}})$. Спостережувані дані для двох пацієнтів (наприклад, пацієнти 5 і 6) були

недостатньо описані двокомпаратментною моделлю. Тому для цих двох пацієнтів був проведений модель-незалежний аналіз із використанням WinNonlin некомпартментного аналізу ВВ-інфузії моделі входу (лінійне правило трапецій для AUC розрахунків). Для некомпартментного аналізу півперіод був розрахований за бета фазою з використанням точок даних, які описують термінальне логарифмічно-лінійне зниження регресії. Мінімум три точки використовувалися для опису фази елімінації. Це відбулося приблизно між 4 і 14 днями. Для РК аналізу антигена були використані "мг/кг" дозові еквіваленти. Ці значення були визначені на основі специфічної активності FIXFc в дозі 60,2 МО/мг. Фактичні часові точки відбору проб, дози й тривалості інфузії були використані для розрахунків. Номінальні часові точки відбору проб і дози були використані для створення таблиць і фігур концентрація-час. Представлені індивідуальні й середні РК параметри і описова статистика. Формальний статистичний аналіз не був проведений, оскільки дозовий діапазон і число пацієнтів у кожній когорті були занадто малими для значущого аналізу.

[0130] Для активності Фактора IX спосіб віднімання базового рівня був застосований до активності в порівнянні з часовим профілем відповідно до дерева розв'язків віднімання базового рівня (Фігура 4). Значення активності < 1% були визначені за 1 МО/дл для загасання до базового рівня. Часові точки перед введенням дози для цілей розрахунків приймали за нуль. Крім того, скоректовані за базовим рівнем дані активності були округлені в точках часу, що представляло повернення до базових рівнів. Фармакокінетичний аналіз був проведений для FIX-активності з відніманням базового рівня в порівнянні з часовими точками, одержаними після введення FIXFc шляхом ВВ інфузії. Модель-залежне оцінювання використовували для аналізу дозових груп ВВ-інфузії. Дані з відніманням базового рівня були оброблені за допомогою комп'ютера для двокомпаратментної відкритої моделі з елімінацією із центрального компартмента з використанням WinNonlin-визначених меж параметрів для розрахунків значень вихідного параметра. Були сгенеровані WinNonlin оцінені константи мікроскопічного ступеня й дані і концентрації FIXFc були оцінені за допомогою функції $1/(Y^{\text{hat}} - Y^{\text{hat}})$. Фактичні часові точки відбору проб, дози й тривалості інфузії були використані для розрахунків. Номінальні часові точки відбору проб і дози були використані для створення таблиць і фігур концентрація-час.

[0131] За відсутності фактичних даних, активність через 168 год. після введення дози (C168) і час до 1 МО/дл вище базового рівня (TBLP1) rFIXFc були одержані з використанням згенерованих WinNonlin констант мікроскопічного ступеня для моделювання рівня активності FIXFc у порівнянні з часовими даними. Індивідуальні й середні РК параметри і описова статистика представлені в цьому Прикладі. Формальний статистичний аналіз не був проведений, оскільки дозовий діапазон і число пацієнтів у кожній когорті були занадто малими для значущого аналізу.

[0132] Результати фармакокінетики FIXFc антигена показали, що концентрації FIXFc у плазмі крові різко зростали після швидкої ВВ інфузії FIXFc, із середніми (\pm SD) C_{max} значеннями 1670 (n=1), 2730 (n=1), 7510 \pm 2480 і 15400 \pm 3960 нг/мл для 12,5; 25; 50 і 100 МО/кг номінальних дозових рівнів, відповідно, і були досягнуті протягом першої півгодини для всіх пацієнтів. Усі FIXFc-проліковані пацієнти мали залежне від дози зростання системного FIXFc експонування в плазмі (як оцінювалося за C_{max} і AUC_{INF}). Хоча і обмежене одним оцінюваним пацієнтом з номінальною дозою 12,5 і 25 МО/кг, спостережуване збільшення як C_{max} , так і AUC_{INF} було обґрунтовано пропорційно дозі в оціненому дозовому діапазоні. (Таблиця 3 демонструє середню концентрацію FIXFc антигена для окремих пацієнтів і груп у співставленні з часовими даними; розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта. Таблиця 4 демонструє середні сумарні дані РК FIXFc антигена окремих пацієнтів і груп, розсортовані за номінальною дозою, фактичною дозою, "мг/кг" еквівалентною дозою і номером пацієнта, демонструє середні сумарні дані РК FIXFc антигена окремих пацієнтів і груп, розсортовані за номінальною дозою, фактичною дозою, "мг/кг" еквівалентною дозою і номером пацієнта, і див. Таблицю 11.)

[0133] Концентрації FIXFc у плазмі крові знижувалися за біекспонентою після короткої ВВ інфузії. Періоди напіввиведення як значень розподілення (альфа), так і елімінації (бета), як видно, були незалежними від дози в інтервалі доз, оцінених за періодами напіввиведення альфа і бета у окремого пацієнта в інтервалі від 9,79 до 21,2 годин і від 71,0 до 140 годин, відповідно. Середні періоди напіввиведення альфа (\pm SD) для 50 і 100 МО/кг номінальних дозових рівнів становили 13,1 \pm 4,77 і 12,1 \pm 2,33 години, відповідно. Середні періоди напіввиведення бета (\pm SD) для 50 і 100 МО/кг номінальних дозових рівнів становили 110 \pm 26,5 і 95,8 \pm 11,1 годин, відповідно. Крім того, були визначені первинні значення параметра РК для Cl , V_{ss} , і MRT і, у цілому, всі, як видно, були незалежними від дози в інтервалі доз, які одержали оцінку. Як показано, ця оцінка обмежена даними по одному пацієнту на 12,5 і 25 МО/кг номінальних дозових рівнях (Таблиця 12 і Фігури 2, 7 і 8.)

[0134] Крім того, середні CI значення становили $2,28 \pm 0,374$ і $2,11 \pm 0,464$ мл/год/кг для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг, відповідно. Середні V_{SS} значення становили $259 \pm 78,5$ і $238 \pm 52,2$ мл/кг для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг, відповідно. Крім того, середні MRT значення становили $112 \pm 21,5$ і $114 \pm 17,1$ год. для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг.

[0135] Результати для скоректованої за базовим рівнем фармакокінетичної активності FIXFc показали, що FIXFc активність різко зросла після короткої ВВ інфузії FIXFc, із середніми ($\pm SD$) модель-прогнозованими C_{max} значеннями 11,9 (n=1), 19,9 (n=1), $41,6 \pm 8,97$ і $98,2 \pm 8,21$ МО/дл для номінальних дозових рівнів 12,5, 25, 50 і 100 МО/кг, відповідно, і була досягнута протягом першої півгодини для всіх пацієнтів. (У Таблиці 5 показана середня скоректована за базовим рівню дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта. У Таблиці 6 показані сумарні PK дані середньої FIXFc активності окремих пацієнтів і групи; розподілені за номінальною дозою, фактичною дозою, "мг/кг" еквівалентною дозою і номером пацієнта.)

[0136] Всі проліковані FIXFc пацієнти мали залежне від дози зростання FIX активності (у порівнянні з базовою відповіддю перед введенням дози). Хоча і обмежене тим, що оцінювався тільки один пацієнт при номінальних дозових рівнях 12,5 і 25 МО/кг, спостережуване зростання як C_{max} , так і AUC_{INF} було обґрунтовано пропорційним дозі всередині оцінюваного дозового діапазону. (Таблиці 6, 9 і 13 і Фігури 3 і 5.)

[0137] Після закінчення інфузії зниження скоректованої за базовим рівнем FIX активності демонструвало біекспоненційний спад; характеризувалося швидкою фазою розподілення (альфа), за якою йшла лінійна логарифмічна фаза елімінації (бета). Під час альфа-фази ступінь зменшення FIXFc активності варіювала зі значеннями півперіоду альфа у окремих пацієнтів від 0,140 до 16,6 годин. Видиме залежне від дози зростання середніх значень півперіоду альфа було змішане у одного пацієнта при номінальних дозових рівнях 12,5 і 25 МО/кг. Напроти, значення півперіоду елімінації (бета), очевидно, є незалежним від дози при дозовому діапазоні зі значеннями бета півперіоду у окремих пацієнтів в діапазоні від 42,1 до 67,4 годин при дозовому діапазоні від 25 до 100 МО/кг. Хоча, півперіод елімінації, що одержав оцінку і був описаний у пацієнта 1, який одержав лікування 12,5 МО/кг rFIXFc, не увійшов у сумарну оцінку через те, що рівні FIX у цього пацієнта детектувались тільки протягом періоду до 96 годин через укорочену термінальну фазу і сприяли недооцінці термінального півперіоду елімінації. Середні періоди напіввиведення бета ($\pm SD$) для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг становили $52,1 \pm 10,4$ і $52,5 \pm 10,1$ годин, відповідно, і $52,5 \pm 9,2$ (діапазон 40-67,4) годин для комбінованих номінальних доз 25, 50 і 100 МО/кг (Таблиці 6, 8 і 13).

[0138] Крім того, були визначені первинні значення параметра PK для CI, V_1 , V_{SS} і MRT і, у цілому, всі, очевидно, були незалежними від дози в оціненому діапазоні доз.

[0139] Крім того, середні значення CI становили $3,77 \pm 1,12$ і $2,89 \pm 0,615$ мл/год/кг для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг, відповідно, і $3,36 \pm 0,928$ мл/год/кг для комбінованих номінальних доз 25, 50 і 100 МО/кг. (Таблиці 6, 8 і 13.)

[0140] Середні значення V_{SS} становили $264 \pm 77,6$ і $179 \pm 31,1$ мл/кг для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг, відповідно, і $226 \pm 69,8$ мл/кг для комбінованих номінальних доз 25, 50, і 100 МО/кг. (Таблиці 6, 8 і 13). Крім того, середні значення MRT становили $71,7 \pm 13,0$ і $62,8 \pm 8,82$ год. для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг, відповідно, і $68,05 \pm 11,16$ год. для комбінованих номінальних доз 25, 50 і 100 МО/кг. (Таблиці 6, 8 і 13.)

[0141] На додаток до первинних PK параметрів, вторинні PK параметри (наприклад, C168, K-значення, IVR і т.д.) були визначені для оцінки тривалості ефекту FIXFc. Як очікувалося, спостерігалось залежне від дози зростання значень C168, TBLP1, TBLP3 і TBLP5. Напроти, K-значення й IVR значення, як видно, були незалежними від дози в оціненому діапазоні доз. У повному дозовому діапазоні модель-прогнозовані й спостережувані K-значення окремих пацієнтів знаходились в діапазоні від 0,61 до 1,02 і від 0,62 до 1,17 МО/дл на МО/кг, відповідно. Середні модель-прогнозовані K-значення для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг становили 0,76 і 0,90 МО/дл на МО/кг, відповідно, і $0,821 \pm 0,1387$ (діапазон 0,61-1,02) МО/дл на 1 МО/кг для комбінованих номінальних доз 25, 50 і 100 МО/кг. Середні модель-прогнозовані IVR значення для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг становили 34,5 і 35,1%, відповідно. Середні спостережувані K-значення для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг становили 0,86 і 1,02 МО/дл на МО/кг, відповідно, і $0,926 \pm 0,1787$ (діапазон 0,97-1,17) МО/дл на 1 МО/кг для комбінованих номінальних доз 25, 50 і 100 МО/кг. Середні спостережувані IVR значення для номінальних дозових рівнів 50 і 100 МО/кг становили 39,2 і 39,8%, відповідно. (Таблиці 6, 7, 8 і 13.) Таблиця 7А-7В шоу7 демонструє вторинні сумарні дані PK активності FIXFc у окремих пацієнтів і групове середнє; сортовані за номінальною дозою, фактичною дозою і номером пацієнта.

[0142] Кожний 1 МО/кг введенного шляхом інфузії rFIXFc підвищував активність FIX у плазмі крові на $0,93 \pm 0,18$ МО/дл у середньому, і це поступове відновлення (К значення) показувало слабку позитивну кореляцію з масою тіла ($R^2=0,336$, $p=0,048$) (Фігура 23).

[0143] Фармакокінетичні оцінки активності FIXFc узгоджувалися з оцінками rFIXFc антигена (наприклад, порівняйте Таблиці 13 і 14). Крім того, спостерігалася відмінна кореляція між активністю rFIXFc і рівнями антигена, що демонструє збереження активності rFIXFc in vivo. (Фігура 9.) Крім того, у порівнянні з накопиченими даними по BENEFIX™ (Wyeth), rFIXFc демонстрував (Таблиця 8) наступне:

- Дозова лінійність від 25-100 МО/кг
- 3-кратне зростання $t_{1/2\beta}$
- 3-кратне зростання середнього часу затримання
- 24% підвищене поступове відновлення
- в 2, 5 рази знижений кліренс

[0144] FIXFc являє собою рекомбінантний гібридний білок, який складається з FIX, прикріпленого до Fc домену людського IgG1. FIXFc розроблений як версія FIX із продовженою дією. Доклінічні дослідження з FIXFc показали подовження періоду напіввиведення активності FIX у порівнянні з BENEFIX™, комерційно доступним рекомбінантним FIX продуктом. Обґрунтуванням для цього дослідження була оцінка безпечності й PK FIXFc у пацієнтів з важкою гемофілією В. Для цього дослідження 12 пацієнтів, що підлягали оцінюванню у віці від 18 до 76 років, підходили для оцінки PK. Кожний пацієнт одержав одне введення FIXFc у номінальній дозі 12,5, 25, 50 або 100 МО/кг маси тіла шляхом внутрішньовенної інфузії протягом приблизно 10 хвилин. Зразки плазми крові для оцінки PK як на активність FIXFc, так і на концентрації антигена, відбирали перед інфузією, а також протягом періоду часу до 14 днів після введення дози. В даному дослідженні були незалежно охарактеризовані PK як FIXFc антигена, так і активності з використанням модель-залежних і модель-незалежних способів.

[0145] FIXFc добре переносився після введення одиничних ВВ доз 12,5; 25; 50 і 100 МО/кг маси тіла. У цьому дослідженні не було доказів серйозних побічних ефектів, пов'язаних з лікарським засобом. У жодного пацієнта не були виявлені нейтралізуючі або зв'язувальні антитіла до rFIXFc.

[0146] Апроксимоване пропорційне дозі зростання C_{max} і AUC_{INF} спостерігалось як для FIXFc антигена, так і для активності після введення доз від 12,5 до 100 МО/кг, але V і Cl були однаковими при всіх дозах. Ці результати показують, що FIXFc антиген і активність демонстрували лінійний PK протягом оціненого дозового діапазону. Порівняно маленькі значення V параметра можуть означати, що FIXFc входить у внутрішньотканинну рідину, але не проникає через клітинну мембрану у внутрішньоклітинні рідини.

[0147] Пікові концентрації в плазмі крові FIXFc антигена й активності спостерігалися протягом 0,5 год. після закінчення інфузії й залишалися виявлюваними протягом декількох днів після введення дози. Свідчення зниженого кліренсу й пролонгованого періоду напіввиведення спостерігалися як для FIXFc антигена, так і для активності.

[0148] Середній кліренс і кінцеві значення півперіоду елімінації, пов'язані з концентраціями FIXFc антигена в дозових рівнях 50 і 100 МО/кг, становили 2,28 і 2,11 мл/год/кг і 110 і 95,8 годин, відповідно. Подібним чином, середній кліренс і кінцеві значення півперіоду елімінації, пов'язані з рівнями активності FIXFc у тому ж дозовому діапазоні, становили 3,77 і 2,89 мл/год/кг і 52,1 і 52,5 годин, відповідно. Порівняння PK результатів FIXFc активності, спостережуваних у даному дослідженні, з повідомленими PK для BENEFIX™ активності (Summary of Product Characteristics of BENEFIX™; 18 листопада, 2009) показало приблизно 3-кратне зменшення FIXFc кліренсу і приблизно 3-кратне збільшення як FIXFc півперіоду кінцевої елімінації, так і середнього часу знаходження в організмі в порівнянні з BENEFIX™.

[0149] Зі спостережуваними покращеннями PK, FIXFc надасть пролонгований захист від кровотеч, дозволяючи знизити частоту ін'єкцій індивідуумам з гемофілією В. Ґрунтуючись на результатах цього дослідження, дозу rFIXFc можна вводити кожні два тижні або двічі на місяць із використанням доз 100 МО/кг і щонайменше раз на тиждень із використанням більш низьких доз. Такий режим потребує введення ін'єкцій рідше. Крім того, використання rFIXFc буде мати інші потенційні клінічні впливи, такі як: доступ до центральних вен; покращене дотримання схеми прийому лікарського засобу; зниження ушкоджень через кровотечі; і підвищений захист суглобів від кровотеч.

Приклад 2. В-ПРОТЯЖНА Фаза 1/2/3 дослідження

[0150] Це буде відкрите, багатоцентрове дослідження безпечності, фармакокінетики і ефективності рекомбінантного, довгодіючого коагулянту Фактора IX Fc гібрида (rFIXFc) у профілактиці й лікуванні кровотечі у раніше пролікованих пацієнтів з важкою гемофілією В.

Лікування FIX продуктами, комерційно доступними на даний час, потребує введення дози 2-3 рази на тиждень. Продукт із пролонгованим періодом напіввиведення, у якого необхідний інтервал між введенням лікарського засобу продовжений до одного разу на тиждень або більше, медичне співтовариство визначило би значущим покращенням у лікуванні пацієнтів з важкою гемофілією.

[0151] Дозові рівні широко варіюють у клінічних профілактичних дослідженнях rFIX продуктів: повідомлювані дози варіюють від 10 до 171 МО/кг (Roth et al., Blood 98:3600 (2001)) або від 40 до 100 МО/кг (MASAC Recommendation 177, National Hemophilia Foundation (Oct. 2006)). Крім того, мінімальні рівні FIX активності під час профілактичного лікування у пацієнтів без клінічних ознак кровотечі прогнозуються в діапазоні між 0,2 і 3,8 МО/дл (Carlsson et al., Hemophilia 4:83 (1998)). Беручи до уваги індивідуальну варіабельність у пацієнта, індивідуалізовані дозові режими на основі клінічного статусу пацієнта є загальноприйнятою практикою.

[0152] Результати Фази 1/2а дослідження (Приклад 1), що оцінює безпечність і фармакокінетику однократної дози замороженої ліпідної лікарської форми rFIXFc продемонстрували, що ліки добре переносяться в дозах у діапазоні від 1 до 100 МО/кг і характеристика PK підтверджує декілька переваг у порівнянні з доступними на даний час способами лікування, а саме період напіввиведення й MRT є в 3 рази довшими, ніж ті, про які повідомлялося раніше для BENEFIX™ (61 година порівняно з 19 годинами). Метою цього дослідження було визначити параметр PK подальшого оцінювання ліофілізованого rFIXFc у людей, порівняти його з BENEFIX™ PK параметром оцінок у людей, і продемонструвати ефективність ліофілізованого rFIXFc для профілактики і лікування кровотечі й безпечності повторюваного введення його дози у попередньо пролікованих пацієнтів з важкою гемофілією В.

[0153] У дослідження увійшло чотири групи: низькодозовий профілактичний режим лікування (n=25), високодозовий профілактичний режим лікування (n=25), режим лікування за вимогою (n=20) і режим лікування при серйозних хірургічних втручаннях (n=5). Група низькодозового режиму включила PK підгрупу (n=16), що одержала дозу BENEFIX™, після чого послідувало лікування rFIXFc.

[0154] Першорядними цілями дослідження є наступні: оцінити безпечність і переносність rFIXFc у всіх лікувальних групах; оцінити ефективність rFIXFc у всіх лікувальних групах; і оцінити ефективність профілактики в порівнянні з терапією за вимогою (порівняння річного числа епізодів кровотечі між Групами 1 і 2 відносно режиму на вимогу Групи 3).

[0155] Другорядними цілями дослідження є наступні: порівняти оцінки параметра PK в rFIXFc і BENEFIX™; оцінити ефективність rFIXFc у групі лікування за вимогою і в хірургічній групі; оцінити і порівняти базові оцінки параметра PK в rFIXFc і на Тижні 26 (\pm 1 тиждень) у підгрупі PK; оцінити реакцію пацієнтів на лікування у всіх групах; і оцінити споживання rFIXFc у всіх групах.

Основні критерії включення:

Чоловіча стать, 12 років і більше, маса тіла щонайменше 40 кг

Діагнована гемофілія В (базовий рівень Фактора IX менше ніж або еквівалентний 2%)

В анамнезі щонайменше 100 днів впливу будь-яким продуктом з Фактором IX

Число тромбоцитів ≥ 100000 клітин/мкл

INR (міжнародне нормалізоване співвідношення) $\leq 1,40$ як визначено за нормальним діапазоном лабораторії, що проводить тест

CD4 число ≥ 200 клітин/мкл

Основні критерії виключення:

Інгібітори Фактора IX в анамнезі

Дисфункція нирок або печінки

Діагнований інший дефект коагуляції, відмінний від гемофілії В

В анамнезі були випадки анафілаксії, пов'язаної з будь-яким ВВ веденням FIX або імуноглобуліну

Прийом системних імуносупресорних лікарських засобів (наприклад, системних кортикостероїдів; однак, HAART (високоактивна антиретровірусна терапія) дозволена)

Приклад 3. Виробництво FIXFc в клітинах HEK293

[0156] FIXFc був одержаний у стабільно трансфікованих HEK293 клітинах, що містять експресійну касету для FIXFc (нативний FIX, з'єднаний прямо з Fc ділянкою) і експресійну касету для одного Fc. У клітини також була трансфікована експресійна касета PC5, яка являє собою ензим, що процесується, який надає можливість повного процесінгу FIX пропептиду. Трансфіковані клітини росли в безсироватковому суспензійному середовищі, що містить вітамін К, і вони секретували три білки: FIXFc димер, FIXFc мономер (один ланцюг FIXFc і один ланцюг

Fc), і Fc димер. FIXFc мономер ("FIXFc") був очищений шляхом колоночної хроматографії (Білок А, Фрактгель DEAE, і Q Сефароза псевдоафінне елювання з низькою іонною силою CaCl_2), і вірус був інактивований і профільований для введення пацієнтам, що є людьми. Також див. Peters et al., Blood. 2010 Mar 11;115(10):2057-64 (Epub 2010 Jan 7); і Патент США No. 7566565;

5 кожний з яких включений у дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

[0157] Коагулююча активність FIXFc була оцінена шляхом кількісного оцінювання його здатності відновлювати активність згортання дефіцитної за FIX плазми крові з використанням MLA Electra 1600C (Medical Laboratory Automation/Instrument Labs, Pleasantville, NY). Результати порівнювали з каліброваною кривою, сгенерованою з використанням серійних розведень FIX стандарту Всесвітньої Організації Охорони здоров'я.

10 [0158] Припускають, що фосфорилування серину і сульфатація тирозину Фактора IX важливі для відновлення in vivo. Повідомлялося, що MONONINE™ (очищений із плазми Фактор IX (pdFIX), комерційно доступний від CSL Berhing) має краще відновлення in vivo, порівняно з BENEFIX™ (рекомбінантний FIX (rFIX)), що є комерційно доступним від Wyeth) через більш високий рівень фосфорилування/сульфатації MONONINE™ (>90%/>90% у порівнянні з <10%/5%). Однак FIXFc, що виробляється в HEK293 клітинах, майже не має фосфорилування/сульфатації (<10%/4%, що дуже схоже на BENEFIX™), і демонструє кращий IVR (1,0 МО/дл на МО/кг), ніж BENEFIX™ (0,7).

20 [0159] Крім того, FIXFc, вироблений, як описано вище, мав значно більш низький (в 10-100 раз) рівень (0,01-0,001%) активованого FIX (FIXa), пов'язаної із продуктом домішки, ніж MONONINE™ (pdFIX) або BENEFIX™ (rFIX) (0,1%). Одержаний у результаті FIXFc буде рідше давати небажані випадки тромбоутворення після введення, ніж MONONINE™ або BENEFIX™.

Приклад 4. Педіатричні дослідження: екстраполяція і взаємозв'язок між розвитком в дорослій й педіатричній популяції

25 [0160] Характеристики пацієнтів, які показують взаємозв'язок з FIX фармакокінетикою, включають залежні від віку фізіологічні зміни (Björkman and Berntorp, Clin. Pharmacokinetics 40:815-32 (2001); and Bjorkman, Hemophilia 9(suppl 1):101-10 (2003)) розмір тіла і його склад (Shapiro, Hemophilia 11:571-82 (2005)). Таким чином, звичайно виявлялося, що приведений у відповідність із масою кліренс (CL) FIX зменшується з віком і/або масою тіла під час росту від дитячого періоду до дорослого стану, з відповідним підвищенням термінального півперіоду ($t_{1/2}$). Для rFIX продукту (BENEFIX™) CL і об'єм розподілення в стаціонарній фазі (Vss) зростають у дітей і потім залишаються постійними в дорослому стані; таким чином, за цими параметрами будуть ретельно спостерігати в педіатричних дослідженнях.

30 [0161] Пікові рівні FIX прокоагулянтної активності (FIX:C) залежать від первинного об'єму розподілення FIX:C після однократних і/або повторних доз FIX. Початкове розподілення FIX є швидким. Однак було показано, що in vivo відновлення (середнє поступове відновлення) для BENEFIX™ було звичайно на 30% нижче, ніж у фактора коагуляції, одержаного із плазми і очищеного моноклональним антитілом (pdFIX) (Roth et al., Blood 98:3600-3606 (2001)). Крім того, дослідження з pdFIX показали, що пацієнти у віці 15 років і молодше мають значно більш низьке відновлення, ніж пацієнти більш старшого віку (White et al., Thromb. Haemost. 73:779-84 (1995)). Тому в педіатричних дослідженнях буде також проводитися моніторинг мінімальних і пікових рівнів.

45 [0162] Оскільки дослідження показали, що діти можуть реагувати по-іншому в порівнянні з дорослими, фармакокінетичні оцінки при базовому рівні 50 МО/кг rFIXFc будуть проведені на дітях зі скороченими фармакокінетичними зразками.

50 [0163] Фаза 1/2а дослідження (SYN-FIXFc-07-001), що оцінює безпечність і фармакокінетичний профіль однократного внутрішньовенного введення rFIXFc в RTPs у віці 18 років і більше із тяжкою гемофілією В, була завершена недавно. Попередні результати цього первинного дослідження на людях демонструють приблизно 3-кратне підвищення фармакокінетичних параметрів (середній термінальний півперіод, MRT і AUC) rFIXFc у порівнянні з тими, що повідомлялись в літературі для BENEFIX™ (див. вище). Крім того, rFIXFc добре переносився і не було зареєстровано ознак реакцій у місці ін'єкції, а також не вироблялися інгібітори. Взяті разом, ці результати з безпечності і фармакокінетики підтримують ініціацію Фази 1/2/3 реєстраційного дослідження (998HB102 Дослідження (B-LONG), див. вище), що оцінює безпечність, фармакокінетику і ефективність rFIXFc у профілактиці й лікуванні кровотечі у 104 RTPs (із щонайменше 100 лікувальних EDs попередніх продуктів) 12 років і більше з важкою гемофілією В (<2%). Коли достатня кількість даних безпечності буде доступною після реєстраційного дослідження, буде розпочата педіатрична програма для подальшого дослідження безпечності й ефективності rFIXFc у дітей. Демонстрація пролонгованого півперіоду rFIX у дорослих буде означати, що для профілактики й лікування

кровотеч у індивідуумів з гемофілією В ін'єкції будуть потребуватися рідше .

Фаза 2/3 Педіатричне RTPs дослідження у раніше пролікованих дітей (вік < 12 років)

[0164] Коли будуть доступні дані з 10 RTPs (≥ 12 років) для 26 EDs з реєстраційного дослідження (Дослідження 998NB 102), буде розпочате Педіатричне Дослідження, фаза 3. Ця фаза 2/3 педіатричного дослідження, відносно RTPs, які мали щонайменше 50 EDs до FIX продуктів до включення в дослідження, буде проведена глобально приблизно в 25 клінічних областях. Приблизно 25 RTPs (для того щоб гарантувати 20 підходящих для оцінки пацієнтів), у віці 2-11 років з важкою гемофілією В (< 2 МО/дл [$< 2\%$] ендогенний FIX), будуть скринінговані й відібрані відповідно до визначених заздалегідь критеріїв. Всі пацієнти, що одержали оцінку, увійдуть у фармакокінетичну частину дослідження (РК із попереднім дослідженням FIX продукту і потім РК з rFIXFc) і будуть одержувати щотижня дозу rFIXFc протягом 52 тижнів. У цьому дослідженні буде фіксуватися поступове відновлення, період напіввиведення in vivo, AUC, і кліренс rFIXFc. Всі пацієнти будуть піддаватися фармакокінетичній оцінці базового рівня з FIX і rFIXFc перед дослідженням, і тривалість дослідження для кожного пацієнта буде становити приблизно 69 тижнів, включаючи скринінг і наступне спостереження.

[0165] Кожний пацієнт одержить 50 МО/кг rFIXFc при першому візиті для фармакокінетичної оцінки, з наступними повторюваними щотижневими введеннями дози 50-60 МО/кг rFIXFc. З урахуванням дотримання режиму пацієнтом, фармакокінетичні проби для попереднього дослідження продукту й для rFIXFc будуть відбирати за скороченою програмою, а саме: перед введенням дози, кінець ін'єкції, $30 + 10$ хвилин, 3 ± 1 година, 24 ± 3 (День 1), 72 ± 3 (День 3), 120 ± 3 (День 5) і 168 ± 3 годин (День 7) після закінчення ін'єкції. Для того щоб досліджувати імуногенність, всі пацієнти одержать з rFIXFc щотижня мінімум 50 EDs. Параметри безпечності будуть включені для негайної оцінки безпечності й переносності, такі як: (а) основні показники стану організму (пульс, тиск крові, частота дихання, температура) перед ін'єкцією rFIXFc і через 30 хвилин після ін'єкції; (б) параметри гематології й коагуляції; (в) клінічна хімія; (г) часті визначення FIX інгібітору з використанням модифікованого за Неймегеном Бетезда-аналізу (безпосередньо перед першим впливом, ED4 [Тиждень 4], ED12, ED24, ED36 і ED50); і (д) небажані явища.

[0166] Ефективність буде оцінюватися за оцінкою числа епізодів кровотечі, інтервалів між кровотечами і кількості лікувань і споживання FIX на оцінюваний рік і на випадок, що потребує лікування.

Фаза 2/3 Педіатричне RUPs дослідження дітей, що раніше не одержували лікування (вік 0-11 років)

[0167] Коли дані по 10 дітям, що раніше одержали лікування (2-11 років) з повною фармакокінетикою і 50 EDs будуть доступні в попередньому дослідженні, буде розпочата Фаза 2/3 педіатричного RUPs дослідження. Це дослідження буде проведено глобально приблизно в 60 клінічних областях. До 30 RUPs (для забезпечення 20 придатних для оцінки пацієнтів) у віці 0 років і більше із серйозною гемофілією В (< 2 МО/дл [$< 2\%$] ендогенний FIX) будуть скриніровані і відібрані відповідно до попередньо визначених критеріїв.

[0168] Участь у дослідженні буде варіювати, оскільки при початку лікування може використовуватися rFIXFc як модифікований профілактичний режим. Очікується, що участь пацієнта в дослідженні буде тривати приблизно чотири роки, включаючи скринінг і спостереження за віддаленими результатами. Очікується, що протягом цього часу більшість пацієнтів досягнуть 50 EDs до rFIXFc. Для того щоб досліджувати імуногенність, всі пацієнти будуть піддані лікуванню приблизно 50 EDs rFIXFc або протягом періоду часу до 4 років. Параметри безпечності будуть включені для негайної оцінки безпечності й переносності: (а) часті визначення FIX інгібітору з використанням модифікованого за Неймегеном Бетезда-аналізу; і (б) небажані явища.

[0169] Ефективність буде оцінюватися за оцінюванням числа епізодів кровотечі, інтервалів між кровотечами й кількості лікувань і споживання FIX за аналізований рік і за випадок, що потребує лікування.

Приклад 5. Біохімічна характеристика, активність і аналіз РК у тварин, що не є людиною

[0170] rFIXFc, вироблений у Прикладі 3, був охарактеризований за своєю посттрансляційною модифікацією, і були одержані наступні результати (див. Таблицю 15 і Фігуру 11). Пропептид rFIXFc був належним чином процесований під час виробництва. Паттерн rFIXFc гамма-карбоксилювання був подібний паттерну rFIX. Крім того, загальне Glu/молекула ($11,2 \pm 0,7$) rFIXFc було порівняним з rFIX. Оскільки гамма-карбоксилювання певних залишків необхідно для активності FIX, ці результати є важливими. Крім того, Ser 158 фосфорилування і Tyr 155 сульфатування rFIXFc були порівняними з rFIX. N-зв'язані глікани в FIX не є повністю сіальовані, так само як в rFIX. rFIXFc O-зв'язане глікозилювання першого EGF домена було

таким самим, як в FIX, хоча й у різних порівняльних співвідношеннях. Asp 64 з rFIXFc мав більш високий ступінь бета-гідроксилювання, ніж rFIX або отриманий із плазми FIX (pdFIX). Активований FIX був присутній у набагато більш низькій концентрації в препараті rFIXFc, ніж в rFIX або pdFIX препаратах, як описано детально в Прикладі 3.

5 [0171] Крім того, rFIXFc був введений різними видами тварин для визначення його активності й параметрів РК. Результати показані в Таблиці 16 і на Фігурах 12-16.

Приклад 6. Гамма-карбоксилювання

10 [0172] Метою цього дослідження було проаналізувати й охарактеризувати γ -карбоксилювання глутамінових кислот (Gla) у доклінічній партії FIXFc матеріалу й комерційно доступних FIX продуктах, охарактеризувати вміст Gla у збагаченій «піковій» фракції і «стрип» фракції високосольового елюювання, спочатку одержаної на етапі псевдоафінної іон-обмінної хроматографії, і надалі розділити на збагачену «пікову» фракцію і на «стрип» фракцію високосольового елюювання шляхом аніон-обмінної ВЕРХ, а потім охарактеризувати різні зразки.

15 [0173] Для досягнення цієї мети, був розроблений ряд додаткових аналітичних способів. Вони включають амінокислотний аналіз (AAA) з використанням лужного гідролізу для визначення (загального) вмісту Gla, пептидну карту (PX/MC) з використанням Lys-C пептидів для визначення розподілення Gla, аналітичну аніонобмінну ВЕРХ інтактних молекул для розділення ізоформ, і активований частковий тромбопластиновий час (aPTT) для визначення біологічної активності.

[0174] Два пептиди, що містять Gla (д) являють собою:

–K1K2: YNSGKL⁷E⁸EFVQGNL¹⁵ER¹⁷ECM²⁰E²¹EK

•[M+H]⁺+6 Gla = 2953,9

•[M+H]⁺+5 Gla = 2909,9

–K3: CSF²⁶E²⁷EAR³⁰EVF³³ENT³⁶ERTT⁴⁰EFWK

•[M+H]⁺+6 Gla = 2959,9

•[M+H]⁺+5 Gla = 2915,9

•[M+H]⁺+4 Gla = 2871,9

25 [0175] Тридцять мікрограм зразка (одержаного зі збагаченої пікової фракції, високосольової стрип-фракції, і кожний зразок з аналітичної аніонобмінної ВЕРХ) були денатуровані, відновлені, алкіловані і перетравлені Lys-C (1:20, E:S). Перетравлювання було зупинено за допомогою 2% TFA, і продукт був вприснутий в колонку Jupiter Phenomenex C18 (2,0 x 250 мм). Розділення здійснювали на приладі Agilent 1100 system. Столпчик був установлений на температуру 25° C і пептиди були елюювані за багатоступінчастим ацетонітриловим градієнтом. Мас-спектрометрія (Thermo-Fisher LCQ) була проведена за способом "Triple Play".

30 [0176] Для аналізу й характеристики вмісту Gla і розподілення доклінічного rFIXFc матеріалу були розроблені додаткові способи. Було проведено γ -карбоксилювання частки глутамінових кислот (Gla) і розподілення доклінічної партії rFIXFc (збагачена пікова фракція) і порівняно з комерційно доступними продуктами. Аналіз продемонстрував такий самий вміст і розподілення Gla, як і в комерційно доступних продуктах. «Стрип» фракція високосольового елюювання була проаналізована і порівняна зі збагаченою піковою фракцією. Аналіз показав знижений рівень γ -карбоксилювання.

40 [0177] FIXFc (збагачена пікова фракція) була виділена на іон-обмінному етапі псевдоафінної хроматографії й потім розділена на 3 ізоформи шляхом аналітичної аніонобмінної ВЕРХ. Завантажені в АЕХ колонкові й розділені зразки були високо γ -карбоксилювані. (Завантаження АЕХ столпчика являє собою стрип фракцію, відібрану під час етапу високосольового елюювання з етапу псевдоафінної іон-обмінної хроматографії.) Завантажені в АЕХ колонки і розділені зразки були біологічно активними. Вміст і розподілення Gla було подібним до rFIX. Пептидна карта показала розподілення 4/5/6 Gla's в K3 пептиді. Пептидна карта демонструє високу кількість 6 Gla's в K1K2 пептиді і незначні кількості 5 Gla's.

45 [0178] FIXFc (стрип пікова фракція) була виділена на іонобмінному етапі псевдоафінної хроматографії і потім розділена на 2 ізоформи шляхом аналітичної аніонобмінної ВЕРХ. Завантажені в АЕХ колонки і розділені зразки мали знижений рівень γ -карбоксилювання. Спостерігався зменшений вміст Gla у порівнянні зі збагаченою FIXFc піковою фракцією. Спостерігався знижений рівень біологічної активності. Пептидна карта демонструє підвищену кількість 5 Gla's в K1K2 у порівнянні зі збагаченою піковою фракцією, що може підтверджувати вплив біологічної активності.

50 [0179] Посилання (кожне з яких є включеним в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання): Dumont JA, et al., Monomeric Fc Fusion Molecules in Therapeutic Abs-From Bench to Clinic, Ch. 33 p779-795; Gillis S, et al., Protein Science (1997) 6:185; White GC, et al., J. Thrombosis

and Haemostasis (1997) 78:261; Hansson K, and Stenflo J, Journal Thrombosis and Haemostasis (2005) 3:2633; and Peters RT, et al., Blood (2010) 115:2057.

Приклад 7. Оцінка rFIXFc про-коагулянтної активності в моделях кровотеч у HemB мишей

Порівняльний потенціал rFIXFc і BENEFIX™ був продемонстрований у HemB мишей в аналізі цільній крові ROTEM in vitro і в моделі кровотечі при відсіканні хвоста у HemB мишей in vivo.

[0180] Здатність rFIXFc формувати міцні й стабільні згустки була оцінена за допомогою Ротаційної Тромбоеластометрії (ROTEM®, Pentapharm GmbH, Munich, Germany) із хлоридом кальцію як активатором (NATEM). Сукупна цільна кров, відібрана з порожнистої вени HemB мишей, була розділена на сім аліквот, у які був доданий rFIXFc до кінцевої концентрації 7,4%, 0,74% і 0,074% нормальної плазматичної FIX активності, або BENEFIX™ до 10%, 1%, 0,1% від норми. У якості негативного контролю, у пробу крові був доданий буфер FIX композиції. Пули в загальній кількості 10 від 5 HemB мишей були створені для завершення дослідження. Реакція NATEM була ініційована додаванням CaCl₂. Досліджувалися параметри коагуляції, включаючи час згортання (CT), час формування згустків (CFT) і альфа кут. Середні значення і SD від CT, CFT і альфа кута підсумовані в Таблиці 17. Дозові відповіді для трьох параметрів нанесені на графік на Фігурі 17. Усі три параметри порівнювали між rFIXFc і BENEFIX™ у досліджуваному дозовому діапазоні ($p > 0,05$ за однофакторним аналізом ANOVA (Крускал-Уолліс)).

[0181] Ефективність у невідкладному випадку rFIXFc була також оцінена в моделі кровотечі при відсіканні хвоста у HemB мишей. (Фігура 18.) Самці HemB мишей були стратифіковані для еквівалентної презентації маси тіла і віку в різних експериментальних групах. Перед відсіканням хвоста миші були анестезовані сумішшю 50мг/кг кетаміну і 0,5 мг/кг дексмететомідину і поміщені на подушку з підігрівом для підтримання температури тіла. Хвости мишей були потім занурені у воду за з температурою 37°C на 10 хвилин для розширення латеральної вени. Після розширення латеральної вени rFIXFc, BENEFIX™ або розчин-наповнювач були введені шляхом ін'єкції у хвостову вену і через 5 хвилин дистальні 4 мм хвоста були відсічені з використанням скальпеля #11 із прямим лезом. Кров, що виливалась, збирали в 13 мл теплового сольового розчину протягом 30 хвилин і втрата крові була кількісно гравіметрично проаналізована. Тестуванню піддавали шість експериментальних груп rFIXFc (720, 360, 240, 120, 80, 40 МО/кг, $n=15$) і три експериментальні групи BENEFIX™ (360, 120, 40 МО/кг, $n=15$). Об'єм втрати крові окремої тварини і крива дозової відповіді медіанної втрати крові показані на Фігурі 19(A), і медіанний об'єм втрати крові кожної експериментальної групи підсумований в Таблиці 18. Дозові відповіді за медіанним об'ємом втрати крові для rFIXFc і BENEFIX™ є порівнянними ($p = 0,9315$ за непарним t критерієм з корекцією Уелча).

[0182] Для визначення того, чи є трикратне збільшення тривалості періоду напіввиведення rFIXFc у порівнянні з BENEFIX™ результатом пролонгованої ефективності rFIXFc, винахідники даного винаходу оцінили ефективність rFIXFc і BENEFIX™ як в аналізі ROTEM® ex-vivo, так і в моделі кровотечі при розсіченні хвостової вени (TVT) у HemB мишей. Фігура 20.

[0183] Для ex vivo аналізу ROTEM®, самці HemB мишей одержали 50 МО/кг rFIXFc або 100 МО/кг BENEFIX™ шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Цільна кров була відібрана з порожнистої вени пролікованих тварин через 5 хв, 24, 72, 96, 120, 168 і 216 години після введення дози rFIXFc ($n=8$ мишей на кожну часову точку) або через 5 хв, 24, 48, 72 і 96 години після введення дози BENEFIX™ ($n=4$ миші/часова точка). Проби крові аналізувалися за допомогою NATEM. Середні значення і SD для CT, CFT і альфа кута показані в Таблиці 19, і CT, CFT і альфа кут у порівнянні з часовими кривими показані на Фігурі 21. У порівнянні з BENEFIX™, rFIXFc продемонстрував порівняльний CT, CFT і альфа кут через 5 хв, але значуще підвищений CT, CFT і альфа кут через 72 год, незважаючи на дозу, яка була в 2 рази нижчою в порівнянні з BENEFIX™.

[0184] Для оцінювання профілактичної ефективності rFIXFc і BENEFIX™, самці HemB мишей були стратифіковані для еквівалентної репрезентації маси тіла і віку до 9 різних дослідних груп. rFIXFc був введений шляхом BV ін'єкції в дозі 4 МО/кг, 13 МО/кг, 40 МО/кг і 120 МО/кг за 72 години перед розсіченням хвостової вени, тоді як ті ж дози BENEFIX™ були введені за 24 години перед травмою. Перед розсіченням хвостової вени миші були анестезовані сумішшю 50 мг/кг кетамін/0,125 мг/кг дексмететомідин/ 0,1 мг/кг бупренекс. Для того щоб дати можливість мишам підтримувати нормальну активність після розсічення хвостової вени, 1 мг/кг розчину атипамезолу було дано для того щоб відмінити вплив дексмететомідину, після чого негайно виконували розсічення латеральної хвостової вени хірургічним скальпелем номер 11 із плоским лезом в області, де діаметр хвоста приблизно дорівнює 3 мм. Кров, що виливалась, змивали теплим сольовим розчином для забезпечення чіткої видимості рани, і миша була потім поміщена окремо в чисту клітину з білою паперовою підстилкою на наступні 24 години. Зупинка

кровотечі і фізична активність спостерігались і фіксувались щогодини протягом 12 годин після травми. Вмираючі миші були негайно піддані евтаназії після ідентифікації, і повний огляд для завершення дослідження був проведений через 24 години після травми. Крива Каплана-Мейера для часу евтаназії і карта ступенів виживаності через 24 години після TVT продемонстровані на фігурі 22. Логарифмічний ранговий критерій визначив, що всі експериментальні групи з дозою вище ніж 4 МО/кг є значуще кращими, ніж група, оброблена розчином-наповнювачем ($p < 0,001$). Крім того, виживаність між мишами, які одержали однакову дозу rFIXFc за 72 год. перед травмою й BENEFIX™ за 24 год. перед травмою є порівнянною ($p = 0,4886; 0,9268; 0,7279$ і $0,5209$ для 4, 13, 40 і 120 МО/кг дозових груп відповідно). Ступені виживаності через 24 години після TVT були нанесені на графік і ED50 значення для кожної молекули було екстрапольовані із кривої, ED50 для двох груп лікування є однаковими для дози 17,8 МО/кг для rFIXFc і 15,4 МО/кг для rFIX. Отже, rFIXFc надавав в 3 рази більшу тривалість захисту у HemВ мишей у порівнянні з порівнянною дозою BENEFIX™, як оцінювалося за виживаністю і повторною кровотечею після травми розсічення хвостової вени. Отже, rFIXFc надавав в 3 рази більшу тривалість захисту у HemВ мишей у порівнянні з порівнянною дозою BENEFIX™, як оцінювалося за виживаністю і повторною кровотечею після травми розсічення хвостової вени.

[0185] На закінчення, як показують дані, незважаючи на те, що доза 15,4 МО/кг BENEFIX™ приводила в результаті до 50% виживаності HemВ мишей при розсіченні хвостової вени через 24 год. після введення дози, 50% виживаності у тварин, що одержали 17,8 МО/кг rFIXFc були досягнуті при травмі через 72 год. після введення дози. Отже, rFIXFc демонструє в 3 рази більш тривалу профілактичну ефективність у кореляції із продовженням його періоду напіввиведення в порівнянні з BENEFIX™. Результати за моделями кровотечі надалі були підтверджені ex vivo аналізом ROTEM® цільної крові у HemВ мишей, пролікованих або 100 МО/кг BENEFIX™, або 50 МО/кг rFIXFc. Через 5 хв. після введення дози, порівнянні покращення в утворенні згустку спостерігалися в обох експериментальних групах. Однак більшість параметрів аналізу ROTEM®, таких як час згортання, час утворення згустку і альфа-кут були значуще краще в rFIXFc-пролікованих мишей протягом періоду від 72 до 216 год. після введення дози, незважаючи на в 2 рази нижчу дозу rFIXFc у порівнянні з BENEFIX™.

[0186] Підводячи підсумок, потенціал rFIXFc у невідкладному випадку є порівняним з таким у BENEFIX™, як показано і в аналізі ROTEM® цільної крові in vitro, і на моделі кровотечі при відсіканні хвоста у HemВ мишей. Пролонгована профілактична ефективність rFIXFc була показана в аналізі цільної крові ROTEM® ex vivo у пролікованих HemВ мишей і вона була визначена як приблизно в 3 рази довша в порівнянні з BENEFIX™ у моделі кровотечі при розсіченні хвостової вени у HemВ мишей. Пролонгована ефективність rFIXFc добре корелює з довшим у 3 рази $T_{1/2}$ rFIXFc у порівнянні з BENEFIX™, що раніше демонструвалися у фармакокінетичному дослідженні у HemВ мишей. Отже, rFIXFc є повністю активним для лікування вимогу, оскільки досягається значуще пролонгований профілактичний захист із потенціалом зменшення частоти введення дози, що є об'єктом вивчення у фазі 3 дослідження.

Приклад 8. Аналіз фармакокінетики й фармакодинаміки rFIXFc і BENEFIX™ після однократного підшкірного введення дози дефіцитним за FIX мишам

[0187] Фармакокінетичні (PK) і фармакодинамічні (PD) профілі рекомбінантного Фактора IX-Fc (rFIXFc) і BENEFIX™ (rFIX) були визначені після однократної внутрішньовенної або підшкірної ін'єкції 200 або 400 МО/кг у дефіцитних за FIX мишей. Цільна кров була відібрана з порожнистої вени ($n=4$ миші/часова точка/обробка). Концентрації rFIXFc і BENEFIX™ у плазмі крові були визначені з використанням специфічного для людського FIX аналізу ІФА. Активність rFIXFc і BENEFIX™ визначалася з використанням аналізу активованого часткового тромбопластинового часу (aPTT). PK аналізи були проведені з використанням модель-залежної методології, яка використовує WinNonLin. Результати показані в Таблицях 22 і 23.

[0188] Для FIXFc, біодоступність у дефіцитних за FIX мишей становила 38% для дози 200 МО/кг і 38-46% для комбінованої дози (антиген ІФА) і 29% для дози 200 МО/кг і 29-39% для комбінованої дози (дослідження aPTT активності) у порівнянні з rFIX, 23% і 19%, відповідно. rFIXFc мав біодоступність підвищену в 1,5-1, 7 рази (доза 200 МО/кг) і в 1,5-2, 5 рази (комбіновані дози) у порівнянні з BENEFIX™.

[0189] Для rFIXFc термінальний півперіод (антиген ІФА) становив 62 год. для дози 200 МО/кг і 51-62 год. для комбінованих доз і термінальний півперіод (дослідження aPTT активності) становив 42 год. для дози 200 МО/кг і 40-42 год. для комбінованих доз, тоді як для BENEFIX™ термінальний півперіод становив 24 год. (антиген ІФА) для дози 200 МО/кг і 17 год. (дослідження aPTT активності) для дози 200 МО/кг. Це вказує на 2,5-2,6 кратне (доза 200 МО/кг і комбінована доза) підвищення півперіоду з rFIXFc.

[0190] Крім того, як показано в Таблицях 22 і 23, rFIXFc мав 4,5-5,6 кратне зростання

AUC/доза і 1,9-3,7 кратне зростання St_{max} /доза в порівнянні з BENEFIX™.

[0191] Рекombінантний фактор IX Fc гібридний (rFIXFc) білок є довгодіючою формою рекombінантного FIX (rFIX), що надасть можливість рідшого дозування rFIX при лікуванні гемофілії В. У мишей і нелюдиноподібних приматів і пацієнтів з гемофілією В rFIXFc має приблизно в 3 рази довший період напіввиведення в порівнянні з rFIX (BENEFIX™). Для профілактичного лікування внутрішньовенне введення rFIX залишається складним способом доставки, особливо у дітей і пацієнтів з важкодоступними венами. Підшкірне введення rFIX представляється більш привабливим шляхом доставки, менш травматичним і з рідшим введенням дози. Таким чином, підшкірне введення rFIXFc заподіє менше болю і дискомфорту ніж внутрішньовенне введення, і приведе до покращеного дотримання режиму лікування, оскільки введення є легшим й займає менше часу, ніж у випадку внутрішньовенного введення. Профілактичний режим також покращить якість життя, і клінічні наслідки будуть включати знижені випадки кровотечі.

[0192] Концентрація rFIXFc у плазмі мишей була підрахована з використанням ІФА, специфічного до людського FIX, за яким оцінювали FIX частину молекули і в аналізі використовувалась мг/кг номінальна доза. Сумарні PK параметри для rFIXFc і BENEFIX™ показані в Таблиці 20 (антиген ІФА) і Таблиці 21 (дослідження активності aPTT) для n=4/група. Обидва аналізи за антигеном і активністю показали, що St_{max} і AUC у випадку rFIXFc були значуще покращені в порівнянні з BENEFIX™. При використанні антигена ІФА, біодоступність (F %) становила 38% для rFIXFc у порівнянні з 23% для BENEFIX™. Подібним чином, при використанні дослідження активності aPTT біодоступність становила 29% для rFIXFc у порівнянні з 19% для BENEFIX™. Таким чином, rFIXFc у порівнянні з BENEFIX™ демонстрував підвищення біодоступності в 1,5-1,6 раз. Оцінки півперіоду елімінації показали, що rFIXFc помітно підвищував півперіод, як було підраховано за аналізами антигена (rFIXFc 62 год. у порівнянні з BENEFIX™ 24 год) або активності (rFIXFc 42 год. у порівнянні з BENEFIX™ 17 год). Ці дані показують, що rFIXFc мав півперіод, подовжений у порівнянні з BENEFIX™ у 2,6-2, 5 рази.

[0193] rFIXFc, що вводять підшкірно дефіцитним за FIX мишам, демонстрував PK і PD профіль зі зростаннями St_{max} і AUC для rFIXFc у порівнянні з BENEFIX™. У цілому, біодоступність для rFIXFc знаходилась в діапазоні від 29% (активність) до 38% (антиген) з півперіодом від 42 год. (активність) до 62 год. (антиген) у порівнянні з BENEFIX™, який мав біодоступність від 19-23% і півперіод від 17-24%, відповідно. Таким чином, півперіод для rFIXFc, введеного підшкірно дефіцитним за FIX мишам, продемонстрував зростання від приблизно у 2,2 (антиген) рази до 3,3 (активність) рази в порівнянні з комерційно доступними rFIX продуктами, що вводяться внутрішньовенно. У цілому, ці дані підтверджують, що зауваження, відносно rFIXFc, який вводять підшкірно, буде мати клінічні переваги для профілактичного лікування пацієнтів з гемофілією В.

Приклад 9. Фармакокінетичний аналіз rFIXFc після однократного підшкірного введення дози яванським макакам

[0194] Фармакокінетичний профіль (PK) рекombінантного Фактора IX-Fc (rFIXFc) був досліджений після однократного підшкірного введення дози 50 МО/кг, 100 МО/кг або 200 МО/кг яванським макакам. Концентрація rFIXFc у плазмі крові була підрахована з використанням FIX-специфічного ІФА. Первинний аналіз був проведений з використанням модель-залежної методології з використанням WinNonLin. Див. Таблиці 22-25.

[0195] Фармакокінетичний аналіз концентрації в плазмі в порівнянні з часовими даними (підрахований за FIX-специфічним ІФА) продемонстрував, що біодоступність і термінальний півперіод були однаковими за різних доз. Біодоступність rFIXFc становила 40% (50 МО/кг), 34% (100 МО/кг), 36% (200 МО/кг) і 36-45% (комбіновані дози). Термінальні півперіоди для rFIXFc становили 61 год. (50 МО/кг), 45 год. (100 МО/кг), 49 год. (200 МО/кг) і 44-58 год. (комбіновані дози).

[0196] Концентрація rFIXFc у плазмі крові мав була виміряна з використанням FIX-специфічного ІФА, який вимірював FIX частину молекули, і в аналізі була використана мг/кг номінальна доза. Аналізи піку і відновлення продемонстрували точність цього FIX-специфічного ІФА аналізу для детекції rFIXFc у діапазоні оцінюваних плазматичних концентрацій. Зведення PK параметрів для rFIXFc показано в Таблиці 22 (50 МО/кг), Таблиці 23 (100 МО/кг) і Таблиці 24 (200 МО/кг) для n=3/група. Для rFIXFc SC геометричні середні і CV% геометричного середнього для St_{max} становили 860 + 22 (50 МО/кг), 1630 + 97 (100 МО/кг) і 3,750 + 26 (200 МО/кг), відповідно вказуючи на залежне від дози зростання. Подібні зростання спостерігалися для AUC. Геометричні середні для біодоступності (F %) становили 40 + 16 (50 МО/кг), 30 + 75 (100 МО/кг) і 36 + 27 (200 МО/кг), демонструючи, що біодоступність була однакою при різних дозах.

Вимірювання термінального півперіоду показали, що півперіод був однаковий у діапазоні доз 58 + 39 год. (50 МО/кг), 45 + 13 год. (100 МО/кг) і 46 + 44 год. (200 МО/кг).

[0197] rFIXFc, введений підшкірно яванським макакам, демонстрував РК профіль із залежним від дози зростанням C_{max} і AUC. У цілому, біоактивність знаходилась в діапазоні 30-40% з півперіодом 45-58 год. Таким чином, півперіод для rFIXFc, введеного підшкірно макакам, демонстрував приблизно 2,8-кратне зростання в порівнянні з комерційно доступними rFIX продуктами, що вводяться внутрішньовенно. У цілому, ці дані підтримують погляд, що rFIXFc, який вводиться підшкірно, буде мати клінічні переваги для профілактичного лікування пацієнтів з гемофілією В.

Приклад 10. Рекомендовані профілактичні дозові режими

[0198] У порівнянні зі стандартними рекомендованими дозовими режимами від 25 до 40 МО/кг FIX двічі або тричі на тиждень, медіанна rFIXFc активність РК, одержана в ході Фази 1/2а дослідження, описаного вище, підтверджує, що введення rFIXFc приблизно один раз на тиждень в дозі приблизно 22,5 МО/кг, або введення приблизно кожні 10 днів дози приблизно 45 МО/кг, або введення приблизно кожні 2 тижня дози приблизно 120 МО/кг є достатнім для підтримання мінімального рівня на 1% вище базового рівня (Фігура 24). Ці модель-симульовані оцінки валідовані за доступним даними з Фази 1/2а дослідження, яке повністю попадає в 95% довірчий інтервал модельованої кривою «активність відносно часу». Ці режими часто будуть слугувати для початку терапії. Беручи до уваги гетерогенність повідомлюваних клінічних випадків проривної кровотечі відносно мінімального рівня плазматичної FIX активності, підтримуючі дози необхідно буде розраховувати індивідуально.

[0199] Після перерахунку РК результатів Фази 1/2 дослідження (див. Приклад 11), новий розрахунковий дозовий режим, наприклад, для профілактики, становить 20 МО/кг один раз на тиждень, 40 МО/кг кожні 10 днів або 100 МО/кг кожні два тижні (двічі на місяць). Див. також Таблицю 27 і Фігуру 25.

Приклад 11. Перерахунок фармакокінетичних даних з вперше проведеного на людині (FiH) дослідження (Приклад 1)

[0200] Пацієнти з різними генотипами гемофілії В, такими як стоп кодон/нонсенс і міссенс-мутаціями, були включені в FiH дослідження, обговорюване в Прикладі 1. Декілька пацієнтів мали помітно знижені ендogenous рівні FIX антигена, що корелювало з помітно зниженою FIX активністю, тоді як у декількох пацієнтів з міссенс-генотипами мали більше антигенно, ніж підрахованої активності, що вказує на дисфункціональний циркулюючий білок. FIX активність до лікування у 2 пацієнтів перевищувала 2 МО/дл, імовірно, внаслідок неповного вимивання після останньої інфузії FIX концентрату на основі тестування в анамнезі і фенотипу захворювання. Грунтуючись на цій інформації, дані РК із Прикладу 1 були перерозраховані без віднімання базового рівня, як детально описане нижче. Див. Таблицю 27.

[0201] На відміну від РК розрахунків (основаних на активності) у Прикладі 1, якщо rFIXFc активність РК моделювалася без віднімання базового рівня, як нещодавно повідомлялося для РК аналізу глікопегільованого rFIX (Negrier et al., Blood DOI 10.1182/blood 2011 02 335596 (2011), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання), одержані в результаті оцінки, півперіоду елімінації і MRT є набагато довшими, ніж оцінки в Прикладі 1, на $82,2 \pm 21,6$ і $96,8 \pm 22,0$ години (середнє \pm SD), відповідно. Однак, знаючи, що не всі пацієнти з важкою гемофілією В мають 0% ендogenous FIX активності, і беручи до уваги генотип пацієнта і ендogenous рівень FIX антигена, винахідники даного винаходу адаптували спосіб аналізу з відніманням базового рівня у своєму РК моделюванні. Більш точно, (а) базовий рівень у двох пацієнтів був визначений як 0%, оскільки їх FIX активність перед лікуванням становила <1%, вони не мали виявленого FIX антигена і мали нонсенс-генотипи, (б) базовий рівень у трьох пацієнтів був визначений як 0,5%, оскільки їх FIX активність перед лікуванням була <1% і вони мали виявлюваний FIX антиген, (в) для пацієнтів, чия FIX активність перед лікуванням була в діапазоні між 1 – 2%, C_{min} (найнижча активність у ході РК дослідження) визначалася як базовий рівень, і (г) для пацієнтів, чия FIX активність перед лікуванням була $\geq 2\%$, базовим рівнем було 2% (що було вищою межею значення для входження в дослідження). Активність вище базового рівня перед введенням дози розглядалася як залишкова дія ліків від попереднього лікування, і була зведена до базового рівня і віднята з РК даних після введення дози rFIXFc.

[0202] Одержаний в результаті середній термінальний півперіод, ($56,7 \pm 10,9$ годин, діапазон 42,4 – 74,5 години) і MRT ($71,8 \pm 10$ годин, діапазон 53,2 – 85,9 години) rFIXFc є приблизно в 3 рази довшим, ніж повідомлювані для rFIX. Повідомлюваний термінальний півперіод rFIX становить $19,3 \pm 4,97$ годин (діапазон 11,1 - 36,4 годин) і MRT становить $26,0 \pm 6,07$ годин (діапазон 15,8 – 46,1 годин). Roth et al., Blood 98:3600-3606 (2001); і Summary of Product Characteristics for BENEFIX™, Electronic Medicines Compendium (2010)

(http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20376/SPC/BENEFIX™/#PHARMACODYNAMIC_PROP S), кожна з яких включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. Таким чином, діапазони для rFIXFc не перекривають діапазони для rFIX. Подібним чином, середнє значення CL rFIXFc активності ($3,18 \pm 0,78$ мл/год/кг, діапазон 2,05 – 4,18 мл/год/кг) є приблизно в 2,6 рази меншим, ніж повідомлюване для rFIX ($8,40 \pm 2,01$ мл/год/кг, діапазон 4,66 – 13,64 мл/год/кг), тоді як Vss обох білків є порівняним при 4-5 кратному об'ємі плазми.

[0203] Хоча та ж тенденція покращення показників спостерігалася при РК rFIXFc антигені, і $T_{1/2\alpha}$, і $T_{1/2\beta}$ rFIXFc антигена були значуще довшими, ніж одержані із підрахунків FIX активності. Оцінений $T_{1/2\alpha}$, для rFIXFc антигена, явно відхиляється від того, який у нормі пов'язаний з FIX (2 – 3 години). Крім того, можливе недостатнє вимивання від замісної терапії до дослідження перед інфузіям rFIXFc іноді приводило до більш високого базового значення, яке у свою чергу могло приводити до недооцінки rFIXFc $T_{1/2\beta}$, як підрахованого за FIX активністю. Багато пацієнтів мали aPTT активність до 3 МО/дл, що значно перевищує граничну кількість (1 МО/дл) для aPTT аналізу, на останніх точках часу 336 годин (14 днів) після введення дози. Однак ці часові точки були виключені з оцінки термінального півперіоду, оскільки ці значення або перебували на базових рівнях, або були лише незначно вищими за них, що розглядалось як повернення до базового рівня. Напроти, низькі але виявлювані термінальні рівні rFIXFc можуть бути виявлені шляхом специфічного і високочутливого ІФА rFIXFc антигена, який виявляє 0,1 МО/дл, у порівнянні із найнижчим лімітом для aPTT, що дорівнює 1,0 МО/дл.

[0204] Параметри РК (активність), що залишилися, змінювалися незначуще відповідно до півперіоду елімінації і MRT. Див. Таблицю 27(б). Пропорційне дозі лінійне підвищення FIX активності спостерігалось на основі C_{max} , що виникає відразу ж після інфузії й AUC_{INF} (Таблиця 4). FIX активність демонструвала біекспоненційне загасання після інфузії rFIXFc і характеризувалася швидкою фазою розподілення (альфа), за якою йшла лінійно-логарифмічна фаза елімінації (бета). Середній півперіод розподілення ($T_{1/2\alpha}$) був високо варіабельний у окремих пацієнтів (середнє 3,4 і 10,3 годин для двох груп з більш високими дозами) (Таблиця 27(б)). Середній півперіод елімінації ($T_{1/2\beta}$) був незалежним від дози у терапевтичному дозовому діапазоні, що підлягав тестуванню, тобто становив 53,5 годин, $57,5 \pm 8,2$ годин і $56,5 \pm 14,1$ годин при дозі 25 МО/кг, 50 МО/кг і 100 МО/кг, відповідно. Час до 1% (1 МО/дл) вище базової лінії, при оцінці rFIXFc активності, продемонстрував пропорційне дозі зростання. Він становив 7,3; $10,1 \pm 1,5$ і $12,3 \pm 2,5$ днів для доз 25, 50 і 100 МО/кг, відповідно. Через 168 годин (1 тиждень) після введення дози плазматична FIX активність установилася як $1,1 \text{ МО/дл}$, $2,5 \pm 0,9 \text{ МО/дл}$ і $4,6 \pm 1,7 \text{ МО/дл}$ вище базового рівня для дозових груп 25, 50 і 100 МО/кг, відповідно. Також незалежними від дози були MRT, CL і Vss у межах дозового діапазону від 25 до 100 МО/кг. Крім того, кожний 1 МО/кг введеного за допомогою інфузій rFIXFc піднімав плазматичну FIX активність у середньому на $0,93 \pm 0,18 \text{ МО/дл}$ (Таблиця 27(б)), і це поступове відновлення (K) показало слабку позитивну кореляцію з масою тіла ($R^2=0,336$, $p=0,048$).

[0205] Тривалий емпіричний клінічний досвід підтверджує, що постійна активність фактора в плазмі на рівні 1-2 МО/дл буде достатньою для запобігання спонтанних випадків кровотечі у пацієнтів з важкою гемофілією A і B, (Nilsson et al., J. Intern. Med. 232:25-32 (1992), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання), і підвищенню частоти випадків кровотечі пов'язаних з кількістю часу нижче 1% від нормальної FVIII активності. Collins et al., Thromb Haemost 7:413-420 (2009), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. Таким чином, РК аналізи надають засоби для оптимізації профілактичного лікування з індивідуалізованим моделюванням дози для досягнення постійних мінімальних рівнів вище 1% (1 МО/дл) від базового рівня, зменшення варіабельності пік/мінімум і покращення співвідношення вартість/ефективність лікування. Carlsson et al., Haemophilia 4:83-88 (1998); Kisker et al., Haemophilia 9:279-284 (2003), кожна з яких включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання.

[0206] Для створення профілів концентрація-час, відповідних до різних режимів дозування, було проведено моделювання за способом Монте-Карло з використанням популяційної РК моделі rFIXFc. Середні оцінки параметрів моделі (CL, об'єм розподілення, інтеркомпарментний кліренс і об'єм другого компартмента) у досліджуваній популяції, варіабельність між окремими індивідуумами, і залишкова варіабельність були адаптовані для цієї фази 1/2a дослідження. Wang et al., J. Clin. Pharmacol. 49:1012-1024 (2009), яка включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання. Одна тисяча пацієнтів були змодельовані для дозового режиму з 14-16 точками відбору проб для кожного пацієнта. Було 14 точок відбору проб для щотижневого введення дози, 15 для введення дози кожні 10 днів, і 16 для введення дози раз на 2 тижні. Маса тіла (BW) була змодельованою відповідно до опублікованого способу, Wang et al. (2009), тобто на основі степеневого рівняння $Z=BW-0,5$. Медіанний BW у 1000 пацієнтів був допущений

як 75 кг. На основі модельованих профілів концентрація-час, середнє значення \pm стандартне відхилення (SD) лікарських профілів концентрація-час у 1000 пацієнтів було сконструйовано графічно для різних режимів дозування. Фігура 25.

- [0207] У порівнянні зі стандартним рекомендованим дозовим режимом від 25 до 40 МО/кг
- 5 FIX двічі на тиждень, моделюючи результати медіанної rFIXFc активності РК із цього дослідження показують, що введення один раз на тиждень rFIXFc в дозі 20 МО/кг, або введення кожні 10 днів в дозі 40 МО/кг, або введення кожні 2 тижня в дозі 100 МО/кг є достатнім для підтримки мінімального рівня 1% вище базового рівня. Фігура 25. Ці модель-прогнозовані оцінки
- 10 підтверджені доступними даними цієї Фази 1/2а дослідження, які повністю попадають в 95% довірчий інтервал модельованої кривої «активність відносно часу». Однак, беручи до уваги гетерогенність повідомлюваних клінічних випадків проривної кровотечі відносно мінімального рівня плазматичної FIX активності (Bjorkman, Haemophilia, 9:101-110 (2003); Ahnstrom et al Haemophilia, 10:689-697 (2004), кожна з яких включена в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання) підтримуюча доза вірогідніше буде потребувати індивідуального
- 15 підбору.

Таблиці

Полінуклеотидні послідовності: FIX-Fc

A. FIX-Fc ланцюги ДНК послідовність (SEQ ID NO:1, яка кодує SEQ ID NO:2)

pSYN-FIX-030 Нуклеотидна послідовність (nt 1 до 7583):

FIX екзон 1 (сигнальний пептид, 1-а амінокислота пропептиду): nt 690-777

FIX міні інтрон: nt 778-1076

FIX пропептидна послідовність : nt 1077-1126

Зріла FIX послідовність : nt 1127-2371

Fc : nt 2372-3052

```

gcgcgcggtgacattgattattgactagttattaatagtaatacaattacgggggcattagttcatagcccatatatg
gagttccgcgttacataacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaat
aatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtagttacggtaaaactg
cccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcc
tggcattatgcccagtagcatgaccttatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgtcattac
catgggtgatgcggttttggcagtagcatcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccacc
ccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaaactccgccccca
ttgacgcaaatggcggttagcggtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaacccac
tgcttactggccttatcgaaattaatacagactcactatagggagacccaagcttcgcgacgtacggcgccaccatgc
agcgcgtagaatgatcatggcagaatcaccagcgctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtgtctgaa
tgtacaggtttgttctcttttttaaaatacattgagtagcttgcccttttagatatagaaatatctgatgtgtctt
cttcaactaaatttgattacatgatttgacagcaatattgaagagtctaacagccagcacgcaggttggttaagtact
gtgggaacatcacagatttttggctccatgccctaaagagaaattggctttcagattatttggattaaaaacaagac
tttcttaagagatgtaaaattttcatgatgttttcttttggctaaaactaaagaattattcttttacatttcagtt
tttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcggccaaagaggataaattcaggtaaatggaagagtttgt
tcaagggaatctagagagagaatgtatggaagaaaagtgtagttttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactg
aaagaacaactgaattttggaagcagtagttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcaggt
tgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtcccttttgatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaac
atgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaagggtggtttgtcctgtactg
agggatatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttca
caaacttctaagctcaccggtgctgagactgttttctctgatgtggactatgtaaatctactgaagctgaaaccat
tttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaattgacttcactcgggttggtgggagaagatgccaaaccag
gtcaattcccttggcaggttggtttgaatggtaaaagttgatgcattctgtggaggctctatcgtaaatgaaaatgg
attgtaactgctgccactgtgttgaaactgggtgtaaaattacagttgtcgcaggtgaacataatattgaggagac
agaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtaca
accatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgac
aaggaatacacgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaggaggag
atcagcttttagttcttcagtagccttagagttccactgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcacca
tctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccat
gttactgaagtgggaaggaccaggtttcttaactggaattatttagctgggtgaagagtggtgcaatgaaaggcaaata
tggaatatataccaagggtgtcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactgacaaaactcacacat

```

gccacccgtgcccagctccggaactcctgggaggaccgtcagttcttctcttccccccaaaacccaaggacacctc
 atgatctccgggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactg
 gtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtacaacagcacgtaccgtgtgg
 tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctc
 ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatc
 ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgg
 agtgggagagcaatgggagcgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgttgactccgacggctccttcttc
 ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgagaattcagacatgataagatacatt
 gatgagtttgacaaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatgtgaaatttgatgctattgcttt
 atttgtaaccattataagctgcaataaacaagttgggggtggggaagaactccagcatgagatccccgcgtggagg
 atcatccagccggcgtcccggaacgattccgaagcccaacctttcatagaaggcggcggtggaatcgaaatctcg
 tagcacgtgtcagtcctgctcctcgccacgaagtgcacgcagttgcccggccgggtcgcgaggcggaactcccgc
 cccacggctgctcgccgatctcggtcatggccggcccgaggcgtcccgaagtctgtggacacgacctccgaccac
 tcggcgtacagctcgccaggccgcgacccacacccaggccagggtgtgtccggcaccacctggctcctggaccgc
 gctgatgaacagggtcacgtcgccggaccacacccggcgaagtctgctcctccacgaagtcccgggagaaccgagcc
 ggtcgttcagaactcgaccgctccggcgacgtcgcgcggtgagcaccggaacggcactggtcaacttggccatg
 gtttagttcctcaccttgcgtattatactatgccgatatactatgccgatgattaattgtcaacacgtgctgatca
 gatccgaaaatggatatacaagctcccgaggcgtttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctcactactt
 ctggaatagctcagaggcagaggcggcctcgccctctgcataataaaaaaatttagtcagccatggggcggaat
 gggcggaactggcgagttagggcgggatggcgaggtagggcgggactatgggtgctgactaattgagatgc
 atgctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctgggtgctgactaattgagatgcatgct
 ttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctcgctcgagctagcttcgtgaggtccggtgcc
 cgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtcctccgagaagtggggggagggggtcggaattgaaccggtgccta
 gagaaggtggcggggttaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgaggggtgggggagaac
 cgtatataagtgcagtagtcgctgaacgttctttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacaggtgaagtgcctg
 tgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgcctgaattacttccacctggctccagta
 cgtgattcttgatcccgagctggagccaggggcgggccttgcgttttaggagcccttcgcctcgcttgagttga
 ggctggcctggcgctggggcccgcgctgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagt
 ctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccag
 gatctgcacactggatatttcggtttttggggcgcggcgggcgacggggcccggtcgctcccagcgacatgttcggc
 gaggcgggcctcgagcgcgccaccgagaatcggaagggttagtctcaagctggccggcctgctctggtgctg
 gcctcgcgccgctgtatcgccccgcctggggcgcaaggctggcccggtcggcaccagttgctgagcggaaga
 tggccgcttcccgccctgctccagggggtcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcggcggggtgagtcacc
 cacacaaaggaaagggcctttccgtcctcagcgtcgcttcatgtgactccacggagtaccggcgccgtccaggc
 acctcgattagttctggagcttttgagtagctgctcttttaggttggggggagggttttatgcatggagtttccc
 cactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaatttgccctttttga
 gtttggtcttgggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgctgtaacac
 gtggtcgggcgccgcccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttcc
 actggtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggaggaccgtcagttcttctcttccc
 cccaaaacccaaggacacctcatgatctccgggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaag
 acctgaggtcaagttcaactggtacgtggagcggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccggggaggagcag

tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
 caagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccac
 aggtgtacaccctgcccccatcccgcatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttc
 tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgtt
 ggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct
 catgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgactc
 gagagatctggccgggtgggcccgtttcgaaggttaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctacgcgta
 ccgggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgtccagccatct
 gttgtttgcccctcccctgcttctccttgacctggaagggtgacctcccactgtccttcttaataaaatgagga
 aattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggatt
 gggagacaatagcagggcatgctgggatgctgggtgggtctatggcttctgaggcggaagaaccagtggtcggtaat
 acggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgta
 aaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtgcag
 aggtggcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctagaagctcctcgtgcgctctcctgttcc
 gacctgcccgttaccggataacctgtccgcctttctccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgta
 ggtatctcagttcgtgtgaggtcgttccgctcaagctgggtgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgc
 gccttatccggtaactatcgtcttgaggtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaa
 caggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaa
 gaacagtatattggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa
 caaacaccgctggttagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaaga
 tcttttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgggtcatgacattaa
 cctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttctcgtctcgcgcttccgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatg
 cagctcccggagacgggtcacagcttctgtgtaagcggatgcccgggagcagacaagcccgctcagggcgctcagcggg
 tgttggcggtgtcggggtggttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccatatatgcgggtg
 tgaataaccgcacagatgcgtaaggagaaaaataaccgcacagggcgcattcgcattcagggtgcgcaactgttggg
 aagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgcca

В. Фс ДНК послідовність (мишачий Igk сигнальний пептид підкреслений) (SEQ ID NO:3,
 яка кодує SEQ ID NO:4) Це є Фс касета з pSYN-FIX-030. Крім того, існує роздільна Фс
 експресійна касета, яка трансфікується в клітинну лінію в плазміді pSYN-Фс-015, яка
 кодує ту ж саму амінокислотну послідовність, але містить декілька некодуючих змінень.
 Друга копія Фс кодує послідовності запускає в роботу краще співвідношення мономер:
 димер.

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggtccagggtccactggtgacaaaaactcacacatgccaccgtgccagc
 acctgaactcctgggaggaccgtcagttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgacccttaggtcatatgc
 gtggtgggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatccaagacaagcc
 ggggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaagggtccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacac
 cctcccccatcccgcatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgga
 gtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctccttctcctctacagcaagct
 caccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaga
 gcctctcctgtctccgggtaaa

Поліпептидні послідовності

FIX-Fc Мономер гібрид: створений шляхом коекспресії FIX-Fc і Fc ланцюгів.

A. FIX-Fc ланцюг (SEQ ID NO:2):

(28-амінокислотна сигнальна послідовність підкреслена, 18-амінокислотний пропептид підкреслений подвійною лінією, Fc ділянка виділена курсивом.) С-термінальний лізин не представлений у жодній субодиниці; цей процесінг часто спостерігається в рекомбінантних білках, які виробляються у культурі клітин ссавців, а також у білках, одержаних із плазми крові.

FIXFC-SC СУБОДИНИЦЯ:

FIX Сигнальний пептид : -46 mqrvmimae spgliticll gyllsaec

FIX Пропептид : -18 tvfldhenan kilnrpk

FIXFC-SC СУБОДИНИЦЯ:

FIX Сигнальний пептид : -46 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAEC

FIX Пропептид : -18 TVFLDHENAN KILNRPKR

```

1  YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ
51  CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPCFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK
101 NSADNKVVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF
151 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG
201 KVDAFCGGSI VNEKWIPTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV
251 IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL
301 KFGSGYVSGW GRVFKHGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNMFC
351 AGFHEGGRDS CQGDSSGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK
401 VSRVYNWIKI KTKLTDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
451 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
501 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
551 DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF
601 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

```

В. Fc ланцюг (SEQ ID NO:4)

20-амінокислотний сигнальний пептид легкого ланцюга гетерологічного мишачого Igк
(підкреслений):

-20 METDTLLLWV LLLWVPGSTG

Зріла Fc послідовність (відповідно до нумерації людського IgG1 амінокислот з 221 до 447, нумерація EU)

1 DKHTCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

51 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

101 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK

151 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

201 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

Таблиця 3

Концентрація антигена FIXFc у окремого пацієнта відповідно до часових даних;
розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта

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

Таблиця 3

Концентрація антигена FIXFc у окремого пацієнта відповідно до часових даних; розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта (продовження)

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

Таблиця 3

Концентрація антигена FIXFc у окремого пацієнта відповідно до часових даних; розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта (продовження)

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

Таблиця 4

Сумарні дані фармакокінетики FIXFc антигена – окремі пацієнти і середнє групове значення

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

* CL, V_{ss}, MRT, T_{1/2} α і T_{1/2} β для комбінованих доз 12,5-100 МО/кг становлять 2,30±0,46 (1,51-2,72); 250±58,2 (156-366); 110±18,5 (84,5-144); 12,0±4,0 (10,1-18,6, не включаючи двох пацієнтів, чиї PK параметри були визначені шляхом некомпартментного аналізу); і 101±20,9 (78-140), відповідно. Внаслідок корекції округлення або інших помилок, (а) повинне бути 207000, і (б) повинне бути 0,468, (в) повинне бути 52,1.

Таблиця 5

Середня активність FIXFc у окремих пацієнтів і групова і скоректована за базовим рівнем FIXFc активність у порівнянні з часовими даними; Розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта

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

Примітка: Дані, виділені напівжирним шрифтом, представляють повернення до базового рівня і були виключені з аналізу.

Таблиця 5

Середня активність FIXFc у окремих пацієнтів і групова і скоректована за базовим рівнем FIXFc активність у порівнянні з часовими даними; Розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта(продовження)

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

Примітка: Дані, виділені напівжирним шрифтом, представляють повернення до базового рівня і були виключені з аналізу.

Таблиця 5

Середня активність FIXFc у окремих пацієнтів і групова і скоректована за базовим рівнем FIXFc активність у порівнянні з часовими даними;
Розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта(продовження)

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

Примітка: Дані, виділені напівжирним шрифтом, представляють повернення до базового рівня і були виключені з аналізу.

Таблиця 5

Середня активність FIXFc у окремих пацієнтів і групова і скоректована за базовим рівнем FIXFc активність у порівнянні з часовими даними; Розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою, тривалістю інфузії і номером пацієнта (продовження)

Фактичний час (год)	Результат (МО/дл)	Скоректований за базовим рівнем результат (МО/дл)	Фактичний час (год)	Результат (МО/дл)	Скоректований за базовим рівнем результат (МО/дл)	Фактичний час (год)	Результат (МО/дл)	Скоректований за базовим рівнем результат (МО/дл)
Пацієнт 10			Пацієнт 11			Пацієнт 12		
-334,63	1	NC	-912,28	2	NC	-342,58	2	NC
-0,48	2	0,0	-0,15	2	0,0	-1,12	2	0,0
0,25	120	118,0	0,23	110	108,0	0,17	108	106,0
0,50	104	102,0	0,47	106	104,0	0,42	90	88,0
1,22	84	82,1	1,22	96	94,0	1,17	70	68,0
3,22	75	73,2	3,22	92	90,0	3,17	69	67,0
6,22	60	58,4	6,25	81	79,0	6,17	55	53,0
9,22	56	54,6	9,22	70	68,0	9,17	55	53,0
24,22	36	35,0	24,22	53	51,0	24,17	37	35,0
48,22	21	20,0	47,72	33	31,0	48,20	25	23,0
72,22	14	13,0	71,88	25	23,0	72,13	14	12,0
96,12	11	10,0	167,72	8	6,0	95,17	10	8,0
120,22	7	6,0	191,72	8	6,0	119,17	7	5,0
144,22	6	5,0	263,72	4	2,0	167,38	6	4,0
168,22	6	5,0	359,72	3	1,0	239,50	3	1,0
192,18	4	3,0	383,97	3	1,0	287,25	2	0,0
216,22	85	84,0	890,97	14	12,0	526,42	4	2,0
744,95	2	1,0						

Примітка: Дані, виділені напівжирним шрифтом, представляють повернення до базового рівня і були виключені з аналізу.

Таблиця 6

Фармакокінетичні сумарні дані середньої активності FIXFc
у окремих пацієнтів і групі; Розсортовано за номінальною дозою,
фактичною дозою і номером пацієнта

Номіна- льна доза (МО/кг)	Фактич- на доза (МО/кг)	Паці- єнт	C _{max} (МО/дл)	AUC _{INF} (год.* МО/дл)	AUC _α (%)	AUC _β (%)	AUC/Доза (МО*год./дл на МО/кг)	Cl (мл/ год./кг)	V ₁ (мл/ кг)	V _{ss} (мл/ кг)	MRT (год)	Альфа HL (год.)	Бета HL (год.)
12,5	13,714	1	11,9	418	0,231	99,8	30,5	3,28	102	157	48,0	0,140	33,3
	N		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	27,25	2	19,9	753	2,50	97,8	27,6	3,62	134	275	76,0	1,20	54,0
	N		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	54,5	3	34,5	1280	5,7	94,5	23,5	4,26	155	365	85,8	2,32	62,9
	54,5	4	48,5	1450	12,4	87,7	26,6	3,76	111	282	75,1	3,64	58,9
	54,5	5	33,0	1190	1,5	98,3	21,8	4,58	160	274	59,9	0,840	42,1
	54,513	6	53,5	2960	1,0	99,1	54,3	1,84	100	149	81,1	1,07	56,7
	55,878	7	38,6	1270	2,2	97,9	22,7	4,41	141	248	56,4	1,07	40,0
	N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Середнє		41,6	1630	4,56	95,5	29,8	3,77	133	264	71,7	1,79	52,1
	SD		8,97 ^a	750	4,75	4,70	13,8	1,12	26,7	77,6	13,0	1,19	10,4
	SE		4,01	335	2,13	2,10	6,18	0,501	11,9	34,7	5,79	0,531	4,65
	Середнє геометричне		40,9	1530	2,98	95,4	27,9	3,59	131	254	70,7	1,52	51,3
	CV% середнє геометричне		21,4	39,1	136,5	5,0	39,4	39,4	21,1	33,8	18,8	68,6	21,0
100	109	10	98,9	3330	18,5	81,3	30,6	3,28	109	216	65,9	6,53	54,6
	109	8	111	4580	28,9	71,1	42,0	2,38	98,0	145	61,1	13,2	54,2
	109	9	92,1	3540	17,0	82,9	32,5	3,08	118	163	53,1	9,43	42,4 ^d
	109,176	11	99,1	5150	28,6	71,3	47,2	2,12	110	162	76,2	16,6	67,4
	109,441	12	89,9	3060	9,2	90,8	28,0	3,58	121	207	57,9	4,19	43,8
	N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Середнє		98,2	3930	20,4	79,5	36,1	2,89	111	179	62,8	9,99	52,5
	SD		8,21 ^b	893 ^c	8,37	8,37	8,17	0,615	8,98	31,1	8,82	4,99	10,1
	SE		3,67	399	3,74	3,74	3,65	0,275	4,02	13,9	3,95	2,23	4,51
	Середнє геометричне		97,9	3860	18,9	79,1	35,4	2,83	111	177	62,4	8,92	51,7
	CV% Середнє геометричне		8,2	22,4	49,7	10,5	22,4	22,5	8,2	17,4	13,8	59,4	19,0

Внаслідок корекції округлення й інших помилок, (а) повинне бути 8,98, (б) повинне бути 8,23, (в) повинне бути 892, і (г) повинне бути 42,2.

Таблиця 7А-7В

Вторинні фармакокінетичні сумарні дані середньої активності FIXFc у окремих пацієнтів і групі; Розсортовано за номінальною дозою, фактичною дозою і номером пацієнта

Номінальна доза (МО/кг)	Фактична доза (МО/кг)	Пацієнт	C168 ^a (МО/дл)	TBLP1 ^b (День)	TBLP3 ^c (День)	TBLP5 ^d (День)	К значення ^e (МО/дл на МО/кг)	К значення ^f (МО/дл на МО/кг)	In Vivo відновлення ^g (%)	In Vivo відновлення ^h (%)
12,5	13,714	1	0,264	4,34	2,13	1,11	0,87	0,95	30,8	33,6
	N		1	1	1	1	1	1	1	1
25	27,25	2	1,09	7,28	3,72	2,06	0,73	0,77	31,8	33,5
	N		1	1	1	1	1	1	1	1
50	54,5	3	2,09	9,79	5,64	3,70	0,63	0,77	33,0	40,2
	54,5	4	2,08	9,58	5,69	3,89	0,89	1,06	37,8	45,2
	54,5	5	1,22	7,50	4,72	3,42	0,61	0,62	33,6	34,6
	54,513	6	4,61	12,2	8,47	6,72	0,98	1,12	38,2	43,6
	55,878	7	1,17	7,37	4,74	3,51	0,69	0,75	29,9	32,6
	N		5	5	5	5	5	5	5	5
	Середнє		2,23	9,29	5,85	4,25	0,76	0,86	34,5	39,2
	SD		1,40	1,98	1,54	1,39	0,17	0,22	3,5	5,5
	SE		0,627	0,886	0,687	0,623	0,074	0,0963	1,6	2,5
	Середнє геометричне		1,96	9,12	5,71	4,10	0,75	0,84	34,4	38,9
	CV% середнє геометричне		60,0	21,2	24,1	28,6	21,5	25,4	10,2	14,4

^a C168 = Оцінена FIX активність вище базового рівня приблизно через 168 год. після введення дози. Значення, виділене курсивом, оцінювали за стимуляцією, здійсненою з використанням однокомpartmentної моделі й констант мікроскопічного ступеня пацієнта.

^b TBLP1 = Модель-прогнозований час після введення дози, коли FIX активність зменшується до приблизно 1 МО/дл вище базового рівня. Значення, виділені курсивом, оцінювали за стимуляцією, проведеною з використанням однокомpartmentної моделі й констант мікроскопічного ступеня пацієнта.

^c TBLP3 = Модель-прогнозований час після введення дози, коли FIX активність зменшується до приблизно 3 МО/дл вище базового рівня.

^d TBLP5 = Модель-прогнозований час після введення дози, коли FIX активність зменшується до приблизно 5 МО/дл вище базового рівня.

^e К-значення було розраховано з використанням модель-прогнозованого C_{max} значення, згенерованого за результатом з відніманням вихідних результатів, розділених на дозу.

^f К-значення було розраховано з використанням спостережуваного максимального результату проби після введення дози; К-значення = (спостережуваний C_{max} з відніманням базового рівня) / (доза).

^g In-vivo відновлення = $100 \times (\text{модель-прогнозоване } C_{max} \text{ за даними з відніманням базового рівня/доза}) \times \text{об'єм плазми (дл)} / \text{Доза в МО}$; де об'єм плазми в мл = $(23,7 \times Ht \text{ в см}) + (9,0 \times Wt \text{ у кг}) - 1709$.

^h In-vivo відновлення = $100 \times (\text{спостережуваний } C_{max} \text{ з відніманням базового рівня}) \times \text{об'єм плазми (дл)} / \text{доза в МО}$; де об'єм плазми в мл = $(23,7 \times Ht \text{ в см}) + (9,0 \times Wt \text{ у кг}) - 1709$.

Таблиця 7В

Номінальна доза (МО/кг)	Фактична доза (МО/кг)	Пацієнт	C1-68 ^a (МО/дл)	TBLP1 ^b (День)	TBLP3 ^c (День)	TBLP5 ^d (День)	К значення ^e (МО/дл на МО/кг)	К значення ^f (МО/дл на МО/кг)	In Vivo відновлення ^g (%)	In Vivo відновлення ^h (%)
100		10	4,08	11,6	8,01	6,34	0,91	1,08	43,4	51,8
	109	8	4,88	12,1	8,57	6,92	1,02	1,17	28,7	33,1
	109	9	3,09	9,87	7,07	5,78	0,84	0,89	39,7	41,8
	109,176	11	6,77	14,7	10,3	8,21	0,91	0,99	27,8	30,3
	109,441	12	3,09	9,96	7,07	5,72	0,82	0,97	35,8	42,2
	N		5	5	5	5	5	5	5	5
	Середнє		4,38	11,6	8,20	6,59	0,90	1,02	35,1	39,8
	SD		1,53	1,97	1,34	1,03	0,0784	0,11	6,8	8,5
	SE		0,685	0,881	0,597	0,459	0,0351	0,0482	3,0	3,8
	Середнє геометричне		4,19	11,5	8,12	6,53	0,90	1,02	34,5	39,1
	CV% середнє геометричне		34,1	16,5	15,7	15,0	8,6	10,5	19,8	21,6

Таблиця 8

Дослідження Фази 1/2а: Порівняння РК параметрів для rFIXFc і BENEFIX™

Параметри	*rFIXFc [Середнє±SD (min – max)] [N=11]	†BENEFIX™ [Середнє±SD (min – max)] [N=11]
t _{1/2} (години)	52,5±9,2 (40 – 67,4)	19,3±4,97 (11,1 – 36,4)
MRT (години)	68,05±11,16 (53,1 – 85,8)	26,0±6,07 (15,81 – 46,09)
CL (мл/год./кг)	3,36±0,93 (1,84 – 4,58)	8,4±2,01 (4,66 – 13,64)
Поступове відновлення (МО/дл на МО/кг)	0,93±0,18 (0,62 – 1,17) ^a	0,75±0,23 (0,34 – 1,38)
C _{max} (МО/дл на МО/кг)	24 год. після ін'єкції	
AUC	48 год. після ін'єкції	

* Оцінки за 2-компаратментним аналізом FIX активності при номінальних дозах 25, 50 і 100 МО/кг (n=11)

†Сумарні характеристики продукту BENEFIX™ (18 листопада, 2009); Медіана і діапазон (n=56)

а. діапазон, скоректований через округлення або інших помилок як 0,63 – 1,18.

У порівнянні зі статистичними даними для BENEFIX™, rFIX-Fc продемонстрував:

- зростання періоду напіввиведення і середнього часу затримання втричі
- 24 % покращення відносного поступового відновлення
- 2,5-кратне зменшення кліренсу

Таблиця 9

Фаза 1/2а дослідження: пропорційне дозі зростання C_{max} і AUC rFIXFc (активність)

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

5 Також див. Фігуру 5.

Таблиця 10А-10В

Оцінена терапевтична тривалість rFIXFc в дозах 50 і 100 МО/кг

Параметр	Геометрична медіана
FIX:С на День 7	2,0 МО/дл (вище базового рівня)
Час при 1 МО/дл вище базового рівня	9,1 днів
Час при 3 МО/дл вище базового рівня	5,7 днів

Параметр	Геометрична медіана
FIX:С на День 7	4,2 МО/дл (вище базового рівня)
Час при 1 МО/дл вище базового рівня	11,5 днів
Час при 3 МО/дл вище базового рівня	8,1 днів

Див. також Фігури 6А-6В.

5

Таблиця 11

Пропорційне дозі зростання C_{max} і AUC для rFIXFc антигена

Доза (МО/кг)	# пацієнтів	C _{max} (нг/мл) [Середнє ±SD]	AUC (год.*нг/мл) [Середнє ±SD]
25	1	2730	144000
50	5	7510±2480	408000±73900
100	5	15400±3960	897000±206000

Див. також Фігуру 7.

Таблиця 12

Фармакокінетичні оцінки для rFIXFc антигена

Параметри	50 МО/кг [Середнє ±SD] (N=5)	100 МО/кг [Середнє ±SD] (N=5)
CL (мл/год./кг)	2,28±0,37	2,11±0,46
V _{ss} (мл/кг)	259±78,5	238±52,2
MRT (години)	112±21,5	114±17,1
t _{1/2} (години)	110±26,5	95,8±11,1

Див. також Фігуру 8А-8В.

10

Таблиця 13

Середні значення РК на основі активності

	C _{max} (МО/дл)	AUC _{INF} (год.* МО/дл)	AUC _a (%)	AUC _b (%)	AUC/ Доза (МО* год./дл на МО/кг)	C ₁ (мл/кг)	V ₁ (мл/ год./кг)	VSS (мл/кг)	MRT (год.)	t _{1/2α} (год.)	t _{1/2β} (год.)
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Середнє	65,364	2596,636	11,591	88,427	32,436	3,555	123,364	226,000	68,045	5,463	52,455
Ст. відхил	32,9708	1497,1234	10,4490	10,5210	10,7506	0,9257	21,2804	69,7582	11,1637		9,1674
										5,4197	
% CV	50,4420	57,6563	90,1479	11,8980	33,1435	27,5890	17,2501	30,8664	16,4063		17,4768
										99,2128	
Медіана	53,500	2960,000	9,200	90,800	28,000	3,580	118,000	216,000	65,900	3,640	54,200
Мінімум	19,90	753,00	1,00	71,10	21,80	1,84	98,00	145,00	53,10	0,84	40,00
Максимум	111,00	5150,00	28,90	99,10	54,30	4,58	160,00	365,00	85,80	16,60	67,40
Геом. середнє	56,951	2181,294	6,781	87,826	31,020	3,226	121,767	216,533	67,218	3,326	51,715
				C ₁₆₈ [1] (МО/ дл)	TBLP ₁ [2] (День)	TBLP ₃ [3] (День)	TBLP ₅ [4] (День)	Поступове відновлення [5] (МО/дл на МО/кг)	Поступове відновлення [6] (МО/дл на МО/кг)	In Vivo Відновлення [7] (%)	In Vivo Відновлення [8] (%)
			n	11	11	11	11	11	11	11	11
			Середнє	3,106	10,177	6,727	5,115	0,821	0,926	34,518	38,991
			Ст, відхил	1,8231	2,3315	2,0089	1,8975	0,1387	0,1787	4,9250	6,6636
			% CV	58,6897	22,9088	29,8623	37,0944	16,8921	19,2940	14,2678	17,0900
			Медіана	3,090	9,870	7,070	5,720	0,840	0,970	33,600	40,200
			Мінімум	1,09	7,28	3,72	2,06	0,61	0,62	27,80	30,30
			Максимум	6,77	14,70	10,30	8,21	1,02	1,17	43,40	51,80
			Геом, середнє	2,621	9,938	6,447	4,761	0,810	0,910	34,202	38,486

Виноски:

Примітка: Значення РК параметра були визначені за допомогою 2-компаратментного способу.

Геом. Середнє = Геометричне Середнє

[1] C168=FIX активність вище базового рівня через 168 год. після введення дози.

[2] TBLP1 = Оцінений час після введення дози, коли FIX активність знизилась до 1 МО/дл вище базового рівня.

[3] TBLP3 = Оцінений час після введення дози, коли FIX активність знизилась до 3 МО/дл вище базового рівня.

[4] TBLP5 = Оцінений час після введення дози, коли FIX активність знизилась до 5 МО/дл вище базового рівня.

[5] Поступове відновлення було розраховано з використанням модель-прогнозованого Стах значення, сгенерованого з результатів з відніманням даних базового рівня, розділених на дозу.

[6] Поступове відновлення було розраховано з використанням спостережуваного максимального результату післядозової проби;

Поступове відновлення = (спостережуване Стах з відніманням базового рівня) /Доза.

[7] In-vivo відновлення = 100 x (Модель-прогнозоване Стах з відніманням базового рівня даних/Доза) x Об'єм плазми (дл)/Доза в МО;

де об'єм плазми в мл = (23,7 x Ht в см) + (9,0 x Wt у кг) - 1709.

[8] In-vivo відновлення = 100 x (Спостережуване Стах з відніманням базового рівня) x Об'єм плазми (дл)/Доза в МО; де об'єм плазми в мл = (23,7 x Ht у см) + (9,0 x Wt у кг) - 1709.

Таблиця 14

Середні значення РК на основі рівня антигена

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

Внаслідок корекції округлення або інших помилок, (а) повинне бути 0,46, (б) повинне бути 110, (в) повинне бути 12,0, (г) повинне бути 3,95 і (д) повинне бути 101

Таблиця 15

Біохімічна характеристика Фактора IX

		FIXFc	rFIX	pdFIX
Гамма-карбоксилювання				
aa 1-23 (K1K2 пептид)	% 6 Gla	97,8	96,9	99,6
	% 5 Gla	2,2	3,1	0,4
	% 4 Gla	0	0	0
aa 24-43 (K3 пептид)	% 6 Gla	61,3	63,7	98,9
	% 5 Gla	26,3	30,9	1,1
	% 4 Gla	12,5	5,4	0
Загальний Gla/моль, пептидна карта		11,5	11,6	12,0
Загальний Gla/моль, AAA		11,3±0,3	11,5±0,3	(12)
Вміст пропептидів		не виявлено	не виявлено	не виявлено
β - гідроксилювання Asp 64		70 %	49 %	37 %
Сульфатація Tyr 155		4 %	5 %	(>90 %)
Фосфорилювання Ser 158		<10 %	<10 %	(>90 %)
Ala 148/Thr 148		0/100 %	100/0 %	30/70 %
Активований FIX		<0,0125 %	0,109 +/- 0,00185 %	0,21 +/- 0,010 %
FXIa активація		94,8 +/- 2,4 %	96,6 +/- 1,8 %	Не зроблено

Таблиця 16

Зведення термінальних півперіодів FIXFc і BENEFIX™
після однократного введення дози внутрішньовенно

Види	BENEFIX™	FIXFc
Нормальні миші	12,3 год.	47,2±4,8 год.
Дефіцитні за FIX миші	13,2 год.	46,2±10,1 год.
FcRN KO миші	16,5±3,0 год.	16,9±2,1 год.
FcRN Tg32b миші	14,2±2,9 год.	53,0±6,6 год.
Щури	5,8 год.	34,8±5,3 год.
Дефіцитні за FIX собаки	14-18 год. *	47,5 год.
Мавпа	12,7 год. †	47,3±9,1 год.

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

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

Таблиця 17

Зведення in vitro ROTEM® параметрів для rFIXFc і
BENEFIX™ доданих у пули цільної крові НемВ мишей

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

Таблиця 18

Медіанна втрата крові після відрізання хвоста у
НемВ мишей, пролікованих rFIXFc або BENEFIX™

Доза (МО/кг)	Медіанна втрата крові (мл)		
	rFIXFc (n=15/доза)	BENEFIX™ (n=15/доза)	Наповнювач (n=18)
720	0,101		
360	0,651	0,218	
240	0,298		
120	0,4567	0,564	
80	0,8474		
40	1,0097	0,918	
0			1,1586

Таблиця 19

Ex vivo ROTEM® параметр у НемВ мишей, пролікованих rFIXFc і BENEFIX™

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

Таблиця 20А

PK параметри rFIXFc і BENEFIX™ (200 МО/кг) після
підшкірної ін'єкції однократної дози дефіцитним за FIX мишам (антиген ІФА)

Спо- лука	Доза нг/кг	V/F мл/кг	Tlag год.	AUC _{INF} год.*нг/мл	Абсо- рбція НЛ год.	Елімі- нація НЛ год.	CL/F мл/ год./кг	Tmax год.	Cmax нг/мл	AUC/Доза год.кг/дл:	Cmax/ Доза г/мл	F %
BENEFIX	727273	3920	2,86	6397	1,96	23,9	114	10,6	148	0,00880	0,204	23,3
rFIXFc	3278689	2071	0,896	141370	7,67	61,9	23,2	27,3	1178	0,0431	0,359	38,1

Таблиця 20В

PK параметри rFIXFc і BENEFIX™ (200 МО/кг) після підшкірної ін'єкції однократної дози дефіцитним за FIX мишам (аналіз aPTT активності)

Сполука	Доза нг/кг	V/F мл/кг	Tlag год.	AUCINF год.*нг/мл	Абсорбція HL год.	Елімінація HL год.	CL/F мл/год./кг	Tmax год.	Cmax нг/мл	AUC/Доза год. кг/мл:	Cmax/Доза г/мл	F %
BENEFIX	207	54,8	0,631	93,9	7,01	17,2	2,20	16,0	2,04	0,454	9,86	18,9
rFIXFc	172	25,1	2,32	418	6,84	42,4	0,411	23,8	4,82	2,43	28,0	29,1

Таблиця 21

PK і PD аналізи rFIXFc і BENEFIX™ після однократного підшкірного введення дози дефіцитним за FIX мишам

	Аналіз	AUC/Доза (год.* кг/мл)	Елім. Півперіод (год.)	CL/F (мл/год./кг)/%	Tmax (год.)	Cmax/Доза (кг/мл)	F (%)
rFIXFc 200 МО/кг	Антиген	0,041	61,9	23,2	27,3	0,00035	38,1
BENEFIX™ 200 МО/кг	Антиген	0,0073	23,9	114	10,6	0,00017	23,3
Співвідношення (rFIXFc/ BENEFIX™)	Антиген	5,62	2,59	0,20	2,58	2,05	1,63
rFIXFc 400 МО/кг	Антиген	0,042	50,9	23,7	18,3	0,00045	45,6
BENEFIX™ 400 МО/кг	Антиген	0,0089	20,2	113	8,13	0,00024	20,2
Співвідношення (rFIXFc/ BENEFIX™)	Антиген	4,72	2,52	0,21	2,25	1,91	2,26
		AUC/Доза (год.* кг/мл)	Елім. Півперіод (год.)	CL/F (мл/год./кг)/%	Tmax (год.)	Cmax/Доза (кг/мл)	F (%)
rFIXFc 200 МО/кг	Активність	0,021	42,4	41,1	23,8	0,00024	29,1
BENEFIX™ 200 МО/кг	Активність	0,0047	17,2	220	16,0	0,00010	18,9
Співвідношення (rFIXFc/ BENEFIX™)	Активність	4,47	2,46	0,19	1,49	2,40	1,54
rFIXFc 400 МО/кг	Активність	0,028	40,3	35,6	15,9	0,00037	39,2
BENEFIX™ 400 МО/кг	Активність	0,0052	15,6	193	18,1	0,00010	15,5
Співвідношення (rFIXFc/ BENEFIX™)	Активність	5,38	2,58	0,18	0,88	3,70	2,53

Таблиця 22

PK параметри rFIXFc (50 МО/кг) після однократної
підшкірної ін'єкції дози яванським макакам

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

Таблиця 23

PK параметри rFIXFc (100 МО/кг) після однократної
підшкірної ін'єкції дози яванським макакам

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

Таблиця 24

PK параметри rFIXFc (200 МО/кг) після підшкірної
однократної ін'єкції дози яванським макакам

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

Таблиця 25

PK аналіз rFIXFc після однократного підшкірного введення дози яванським макакам

rFIXFc (МО/кг)		AUC (год.* нг/мл)	Абс. Півпе- ріод (год.)	Елім. Півпе- ріод (год.)	CL/F (мл/ год./кг)/%	Tmax (год.)	Cmax (нг/ мл)	F(%)
50	Геом. середнє	99000	7,72	57,9	8,28	25,7	860	39,7
	CV% Geo. Mn	15,8	16,4	39,4	15,8	2,68	21,7	15,9
100	Геом. середнє	221959	5,71	43,8	7,38	19,2	2585	44,5
	CV% Geo. Mn	9,89	15,5	16,5	9,70	4,78	19,8	10,0
200	Геом. середнє	354000	6,27	46	5,83	20,4	3750	35,5
	CV% Geo. Mn.	26,4	67,6	44,2	58,3	27	25,9	26,5

Біодоступність у діапазоні від 35,5 до 44,5 % для rFIXFc
5 Півперіод елімінації в діапазоні від 43,8 до 57,9 годин для rFIXFc

Рекомендації з дозування rFIXFc для терапії Гемофілії В

Тип кровотечі	Необхідна концентрація фактора ІХ (%)	Частота дозування (години)
Незначна		
Носова кровотеча		
Гемартрози, неускладнені	20-30	48
Поверхнева м'язова	20-30	48
Поверхнева м'якої тканини	20-30	48
Помірна		
Носова кровотеча		
Внутрішнім'язова з розсіченням	25-50	48
М'яка тканина з розсіченням	25-50	48
Слизові мембрани	25-50	48
Видалення зуба	25-50	48
Гематурія	25-50	48
Гемартрози, з обмеженою рухливістю	40-80	48

Пацієнту необхідно проконсультуватися зі своїм лікарем, але він повинен приймати тільки 1 наступну дозу не раніше ніж через 24-48 годин після прийому першої дози.

5 А

Таблиці 27А і 27В

Порівняння даних з використанням розрахунків в (А) Прикладі 1 і (Б) Прикладі 11

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

B

Доза (МО/кг)	Параметр (середнє±SD) (Діапазон)										
	n	C _{max} (МО/дл)	AUC _{INF} (год· МО/дл)	CL (мл/ год./кг)	V _{ss} (мл/кг)	MRT (год.)	T _{1/2α} (год.)	T _{1/2β} (год.)	Посту- пове відно- влення (МО/дл наг МО/кг)	C _{168h} (МО/дл) [†]	Час до 1 % вище базо-вого рівня (День) [‡]
25	1	20,4	766	3,56	271	76,2	0,61	53,5	0,77	1,11	7,3
50	5	47,5±12,8 (33,0-61,1)	1700±550 (1300- 2660)	3,44±0,84 (2,05-4,18)	262±55,4 (163-296)	76,8±6,7 (67,9-85,9)	3,4±3,4 (0,13-8,72)	57,5±8,2 (47,9-67,2)	0,87±0,21 (0,63-1,12)	2,46±0,89 (1,63-3,92)	10,1±1,5 (8,4-12,3)
100	5	98,5±7,9 (90,8-110)	4020±986 (3090- 5130)	2,84±0,66 (2,13-3,55)	183±27,9 (162-221)	65,9±10,3 (53,2-76,5)	10,3±5,6 (3,97-16,6)	56,5±14,1 (42,4-74,5)	1,02±0,11 (0,89-1,18)	4,65±1,73 (3,08-6,85)	12,3±2,5 (9,9-15,0)
25-100	11	NA§	NA§	3,18±0,78 (2,05-4,18)	227±58,6 (162-296)	71,8±10,0 (53,2-85,9)	NA§	56,7±10,9 (42,4-74,5)	0,93±0,18 (0,63-1,18)	NA§	NA§

Представлені результати є середнім ± SD з діапазоном, зазначеним у дужках

- 5 C_{max} демонструє максимальну концентрацію; AUC_{INF}, площа під кривою (нульовий час, екстрапольоване до часу на нескінченності); CL, кліренс; V_{ss}, об'єм розподілення в стабільному стані; MRT, середній час затримання; T_{1/2α}, півперіод розподілення; T_{1/2β}, півперіод елімінації; NA, не застосовне

Поступове відновлення було розраховано з використанням спостережуваного C_{max} з відніманням значення базового рівня перед лікуванням і розділеного на дозу

- 10 [†] Плазматична FIX активність вище базового рівня через 168 годин (7 днів) після введення дози

[‡] Модель-прогнозований час після введення дози, коли FIX активність зменшується до 1 МО/дл вище базового рівня суб'єкта

- 15 [§] Дані не застосовні, оскільки параметри не є незалежними від дози, у такий спосіб середнє і SD значення не були розраховані в різних дозових групах

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.
Pierce, Glenn
Truex, Samantha
Peters, Robert T.
Jiang, Haiyan

<120> ПОЛІПЕПТИДИ ФАКТОРУ ІХ ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 2159.273PC06

<140> PCT/US2011/043569
<141> 2011-07-11

<150> 61/470,951
<151> 2011-04-01

<150> 61/442,079
<151> 2011-02-11

<150> 61/438,572
<151> 2011-02-01

<150> 61/430,819
<151> 2011-01-07

<150> 61/424,555
<151> 2010-12-17

<150> 61/363,064
<151> 2010-07-09

<160> 4

<170> патентна версія 3.5

<210> 1
<211> 7583
<212> ДНК
<213> штучний
<220>
<223> FIX-Fc ланцюги ДНК (pSYN-FIX-030)

<400> 1
gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag
60
ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct
120
gaccgccccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc
180
caatagggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg
240
cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaa
300

ggcccgccg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 360
 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 420
 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 480
 gtttggtttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 540
 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta tataagcaga gctctctggc
 600
 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga
 660
 cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgcagcgcgt gaacatgac atggcagaat
 720
 caccaggcct catcaccatc tgccttttag gatatctact cagtgcgtgaa tgtacagggt
 780
 tgtttccttt tttaaaatac attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg
 840
 ctgtcttctt cactaaatth tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag
 900
 ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggtccc atgcctaaa
 960
 gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa
 1020
 ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt
 1080
 tcttgatcat gaaaacgcca acaaaattct gaatcggcc aagagggtata attcaggtaa
 1140
 attggaagag tttgttcaag ggaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt
 1200
 tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta
 1260
 tgttgatgga gatcagtgtg agtccaatcc atgttttaaat ggccggcagtt gcaaggatga
 1320
 cattaattcc tatgaatggt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga
 1380
 tgtaacatgt aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa
 1440
 caagggtggt tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtctctgta
 1500

accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccgc
1560

tgctgagact gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt
1620

ggataacatc actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgggttg ttggtggaga
1680

agatgccaaa ccaggtcaat tcccttgga ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt
1740

ctgtggaggc tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac
1800

tggtgttaaa attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga
1860

gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa
1920

gtacaacatc gacattgcc ttctggaact ggacgaacct ttagtgctaa acagctacgt
1980

tacacctatt tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaatt ttggatctgg
2040

ctatgtaagt ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagcttttag ttcttcagta
2100

ccttagagtt ccacttggtg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta
2160

taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag
2220

tgggggaccc catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg
2280

gggtgaagag tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaagggtg cccggtatgt
2340

caactggatt aaggaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc
2400

agctccggaa ctctgggag gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac
2460

cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggg gtggacgtga gccacgaaga
2520

ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa
2580

gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca
2640

ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc
2700

ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac
 2760
 cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa
 2820
 aggctttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa
 2880
 ctacaagacc acgcctcccc tgttggactc cgacggctcc ttcttctctt acagcaagct
 2940
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga
 3000
 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt
 3060
 cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa
 3120
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca
 3180
 ataaacaagt tggggtgggc gaagaactcc agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc
 3240
 cagccggcgt cccgaaaaac gattccgaag cccaaccttt catagaaggc ggcgggtggaa
 3300
 tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtctctc tcctcgcca cgaagtgcac gcagttgccg
 3360
 gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcccc caccgctgct cgccgatctc ggtcatggcc
 3420
 ggcccgaggc cgtcccggaa gtctgtggac acgacctccg accactcggc gtacagctcg
 3480
 tccaggccgc gcacccacac ccaggccagg gtgttggtccg gcaccacctg gtctggacc
 3540
 gcgctgatga acagggtcac gtctgtcccg accacaccgg cgaagtctgc ctccacgaag
 3600
 tcccgggaga acccgagccg gtcgggtccag aactcgaccg ctccggcgac gtcgcgcgcg
 3660
 gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggttt agttcctcac cttgtcgtat
 3720
 tatactatgc cgatatacta tgccgatgat taattgtcaa cactgctga tcagatccga
 3780
 aaatggatat acaagctccc gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc
 3840
 ctcaactact ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa
 3900

aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg
 3960
 gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc
 4020
 tgccctgctgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc tgactaattg agatgcatgc
 4080
 tttgcatact tctgcctgct ggggagcctg gggactttcc acaccctcgt cgagctagct
 4140
 tcgtgaggct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cgcacacagt ccccgagaag
 4200
 ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg ggtaaactgg
 4260
 gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgctt tttcccagg gtgggggaga accgtatata
 4320
 agtgcagtag tcgccgtgaa cggtcttttt cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta
 4380
 agtgccgtgt gtggttcccc cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct
 4440
 tgaattactt ccacctggct ccagtagctg attcttgatc ccgagctgga gccaggggag
 4500
 ggccttgccg tttaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggagct
 4560
 ggggccgccc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg tctcgtgct ttcgataagt
 4620
 ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc
 4680
 ttgtaaatgc gggccaggat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gcgggagcgc
 4740
 acggggcccc tgctgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac
 4800
 cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgcgc
 4860
 cgccgtgtat cgcctccccc tgggcggcaa ggctggcccc gtcggcacca gttgcgtgag
 4920
 cggaaagatg gccgcttccc ggcctgctc cagggggctc aaaatggagg acgcggcgct
 4980
 cgggagagcg ggcgggtgag tccccacac aaaggaaagg ggcctttccg tcctcagccg
 5040
 tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgcgtccag gcacctcgat tagttctgga
 5100

gcttttgag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc
5160

acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa ttctccttgg
5220

aatttgccct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca gtgggtcaaa
5280

gtttttttct tccatttcag gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgcc gccaccatgg
5340

agacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca
5400

aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc
5460

tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg
5520

tggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg
5580

tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg
5640

tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca
5700

aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc
5760

agccccgaga accacagggt tacacctgc ccccatcccg cgatgagctg accaagaacc
5820

aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg
5880

agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg
5940

gctccttctt cctctacagc aagctcacgg tggacaagag caggtggcag caggggaacg
6000

tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct
6060

ccctgtctcc gggtaaatga ctcgagagat ctggccggct gggcccgttt cgaaggtaag
6120

cctateccta accctctcct cggctctgat tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac
6180

cattgagttt aaacccgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgtcca gccatctgtt
6240

gtttgcccct cccccgtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccaactccac tgtcctttcc
6300

taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt
 6360
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat
 6420
 gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagtg gcggttaatac ggttatccac
 6480
 agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa
 6540
 ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgtccccctg acgagcatca
 6600
 caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc
 6660
 gtttccccct agaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata
 6720
 cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta
 6780
 tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca
 6840
 gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga
 6900
 cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg
 6960
 tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg
 7020
 tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg
 7080
 caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag
 7140
 aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggggtctgacg ctcagtggaa
 7200
 cgaaaactca cgtaaggga ttttggctat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac
 7260
 gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggta tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct
 7320
 cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg
 7380
 cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat
 7440
 tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa
 7500

taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg
7560

cgggcctctt cgctattacg cca
7583

<210> 2
<211> 688
<212> білок
<213> штучний

<220>
<223> FIX-Fc ланцюги

<220>
<221> СИГНАЛ
<222> (1)..(28)

<220>
<221> ПРОПЕПТИД
<222> (29)..(46)

<220>
<221> Зрілий пептид
<222> (47)..(688)

<220>
<221> РІЗНЕ
<222> (1)..(415)
<223> FIX ділянка

<220>
<221> РІЗНЕ
<222> (416)..(688)
<223> Fc ділянка

<400> 2

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
-45 -40 -35

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
-30 -25 -20 -15

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
-10 -5 -1 1

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
5 10 15

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
20 25 30

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

35		40		45		50									
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
				55					60					65	
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
			70					75					80		
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
		85					90					95			
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
	100					105					110				
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
115					120					125					130
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
				135					140					145	
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
			150					155					160		
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	165						170					175			
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
	180					185					190				
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
195				200						205					210
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
				215					220				225		
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
			230					235					240		
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn
		245				250						255			
Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu
	260					265					270				
Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	Cys	Ile
275					280					285				290	

Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	Gly	Tyr	295	300	305
Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Val	310	315	320
Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys	Leu	Arg	325	330	335
Ser	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Phe	His	340	345	350
Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val	355	360	365
Thr	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	375	380	385
Glu	Glu	Cys	Ala	Met	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Ser	390	395	400
Arg	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	Asp	Lys	Thr	405	410	415
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	420	425	430
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	435	440	445
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	455	460	465
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	470	475	480
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	485	490	495
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	500	505	510
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	515	520	525

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
535 540 545

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
550 555 560

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
565 570 575

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
580 585 590

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
595 600 605 610

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
615 620 625

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
630 635 640

<210> 3
<211> 741
<212> ДНК
<213> штучний

<220>
<223> Фc ДНК послiдовнiсть

<400> 3
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt
60
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc
120
ttctctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
180
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
240
ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
300
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
360
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag
480

aaccaggtea gctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag
540

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gttggactcc
600

gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg
660

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
720

ctctccctgt ctccgggtaa a
741

<210> 4
<211> 247
<212> білок
<213> штучний

<220>
<223> Fc ланцюг

<220>
<221> СИГНАЛ
<222> (1)..(20)
<223> сигнальний пептид легкого ланцюга гетерологічного мишиного Ig

<220>
<221> Зрілий пептид
<222> (21)..(247)
<223> Зріла Fc послідовність

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20 -15 -10 -5

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
-1 1 5 10

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
15 20 25

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
30 35 40

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
45 50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75

```

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
      80                      85                      90

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
      95                      100                     105

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
     110                      115                     120

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
    125                      130                     135                     140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
      145                      150                     155

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
      160                      165                     170

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
     175                      180                     185

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
     190                      195                     200

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    205                      210                     215                     220

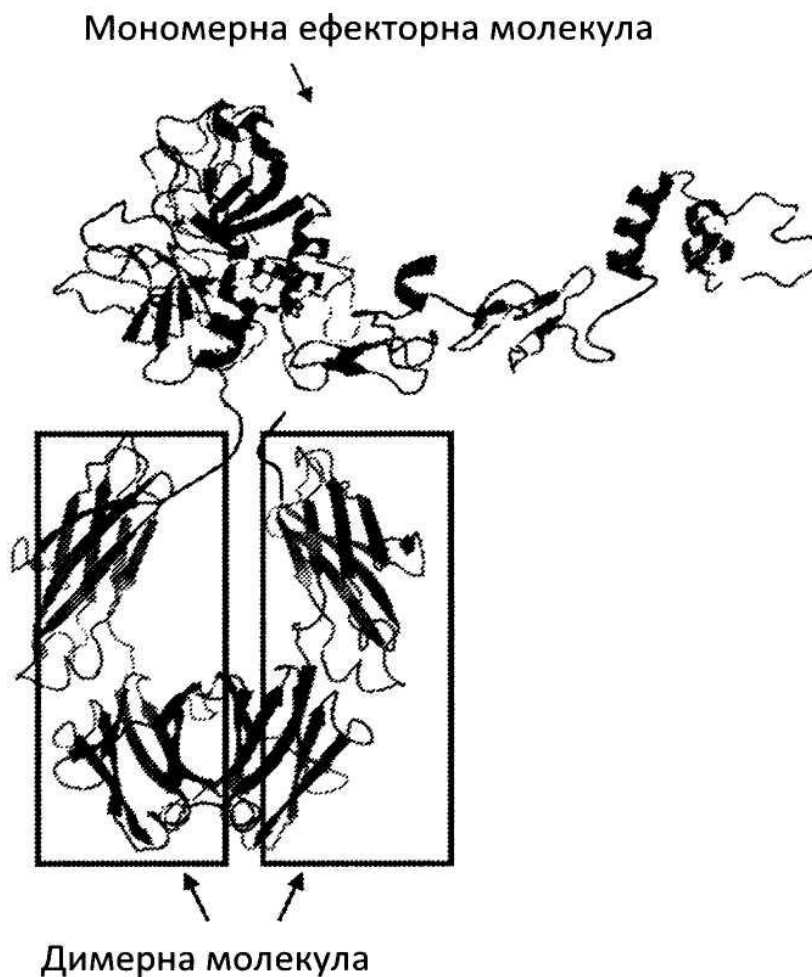
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      225

```

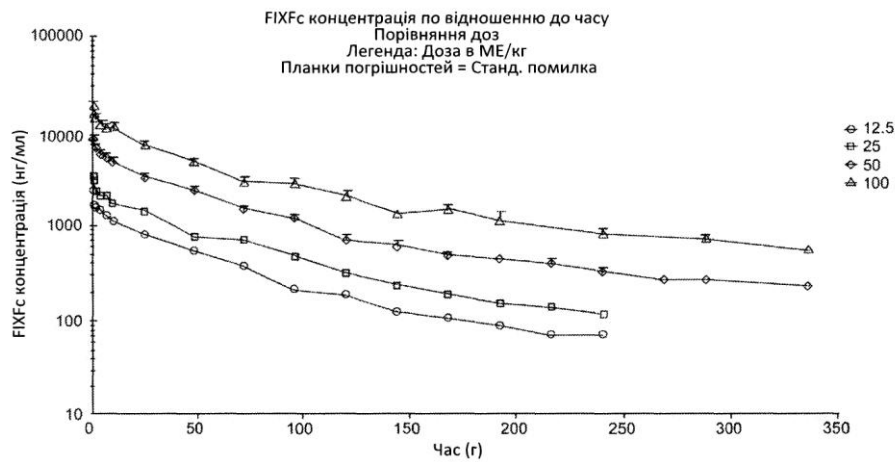
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб контролю або запобігання випадку кровотечі у суб'єкта-людини, що цього потребує, який включає введення суб'єкту химерного поліпептиду Фактора IX (FIX), що включає FIX і зв'язувальний партнер FcRn (FcRn BP), у дозі від 50 до 180 МО/кг з інтервалом дозування від 9 до 18 днів, у якому зазначений FcRn BP включає Fc або альбумін, і у якому концентрація в плазмі крові химерного поліпептиду FIX досягає мінімального рівня щонайменше 1 МО/дл через
- 10 6 днів у згаданого пацієнта.
2. Спосіб за п. 1, у якому химерний поліпептид FIX призначений для профілактичного лікування гемофілії В у суб'єкта-людини, що цього потребує.
3. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 50 до 150 МО/кг.
4. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 50 до 100 МО/кг.
- 15 5. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 50 до 80 МО/кг.
6. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 50 до 60 МО/кг.
7. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 60 до 70 МО/кг.
8. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 70 до 80 МО/кг.
9. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить від 80 до 90 МО/кг.
- 20 10. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому доза становить 50, 60, 70, 80, 90 або 100 МО/кг.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 3-10, у якому інтервал дозування становить 14 днів.
12. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому інтервал дозування становить від 10 до 14 днів і доза становить від 50 до 100 МО/кг.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 3-10, у якому інтервал дозування становить 10 днів.
- 25 14. Спосіб за будь-яким з пп. 3-10, у якому інтервал дозування становить 11 днів.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 3-10, у якому інтервал дозування становить 12 днів.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 3-10, у якому інтервал дозування становить 13 днів.

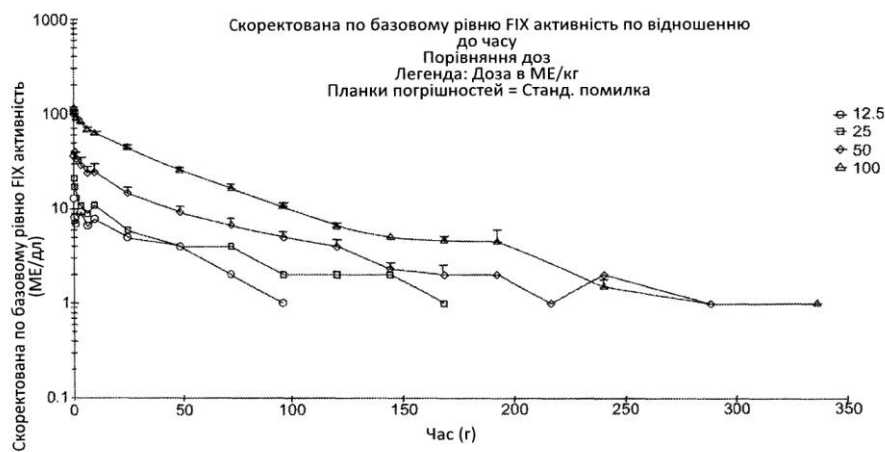
17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, у якому приріст рівня химерного поліпептиду FIX становить більше ніж 0,7 або більше ніж 0,75 мкг/мл.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, у якому химерний поліпептид FIX демонструє один або більше з наступних фармакокінетичних параметрів, вибраних з групи, що включає:
- 5 а) кліренс (КЛ) (активність) становить 1,84-4,58 мл/год./кг;
 б) середній час утримання (СЧУ) (активність) становить 53,1-85,8 год.;
 в) Vss (активність) становить близько 145-365 мл/кг; та
 г) AUC/доза становить 21,80-54,30 МО*год./дл з розрахунку на МО/кг.
- 10 19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-18, у якому химерний поліпептид FIX додатково включає лінкер, що з'єднує FIX та FcRn BP.
20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-19, у якому химерний поліпептид FIX знаходиться у формі гібриду, що містить другий поліпептид, що містить додатковий FcRn BP, пов'язаний з першим FcRn BP.
- 15 21. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, у якому химерний поліпептид FIX придатний для введення як частина фармацевтичної композиції, що містить щонайменше одну допоміжну речовину.
22. Спосіб за будь-яким з пп. 1-21, у якому химерний поліпептид FIX придатний для введення внутрішньовенно або підшкірно.



Фіг. 1



Фіг. 2

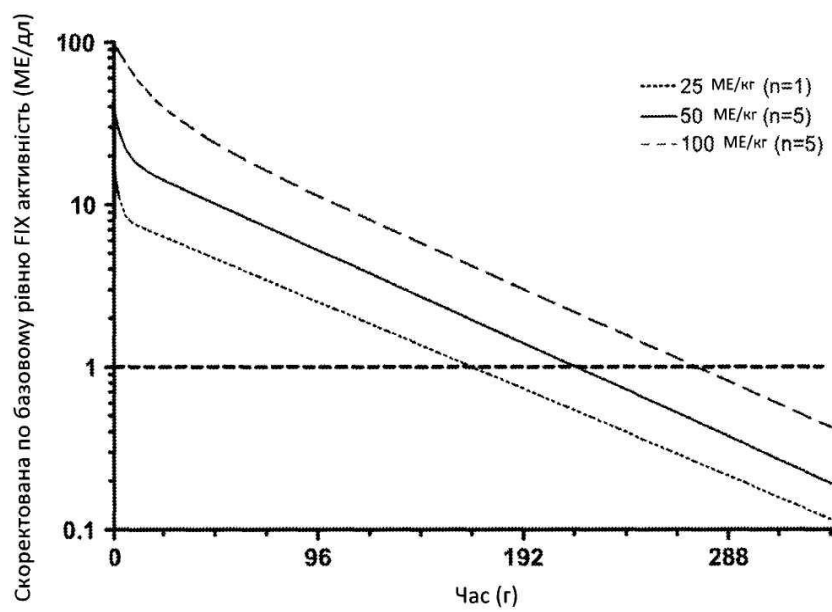


Фіг. 3

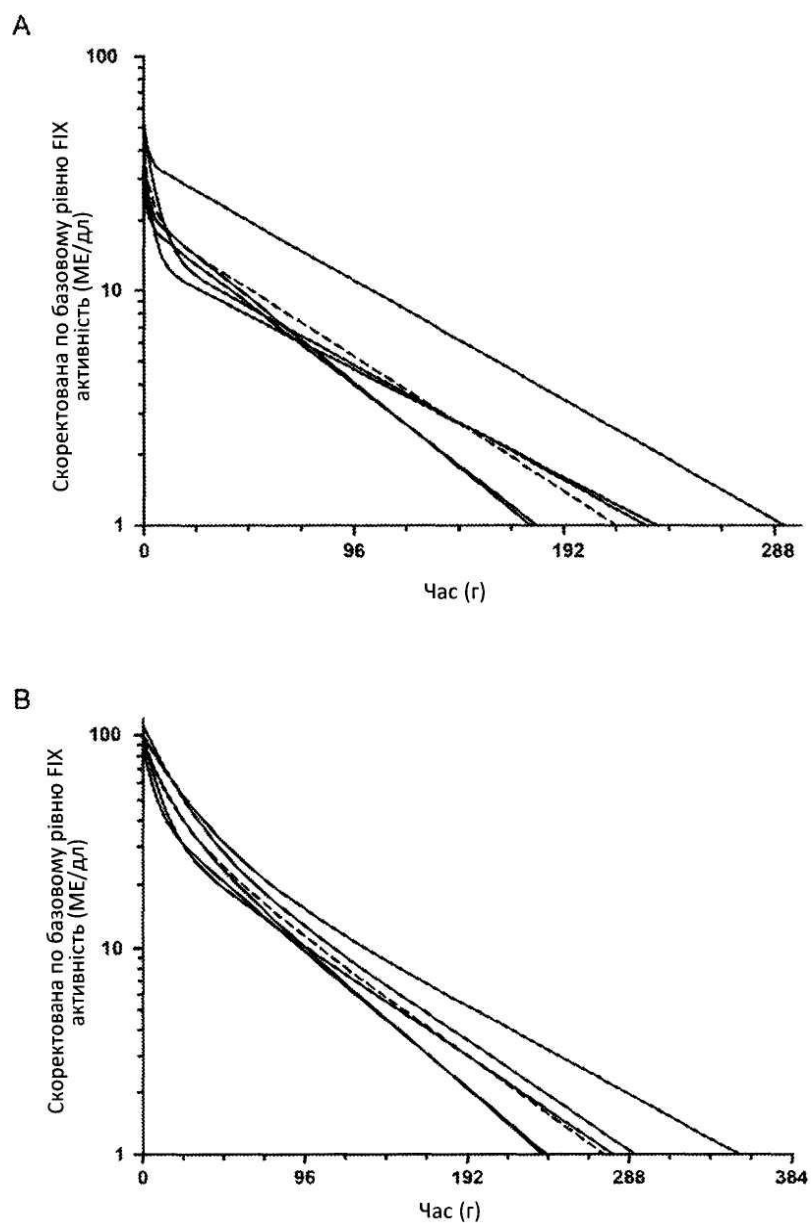
Дерево рішень віднімання базового рівня (BS)



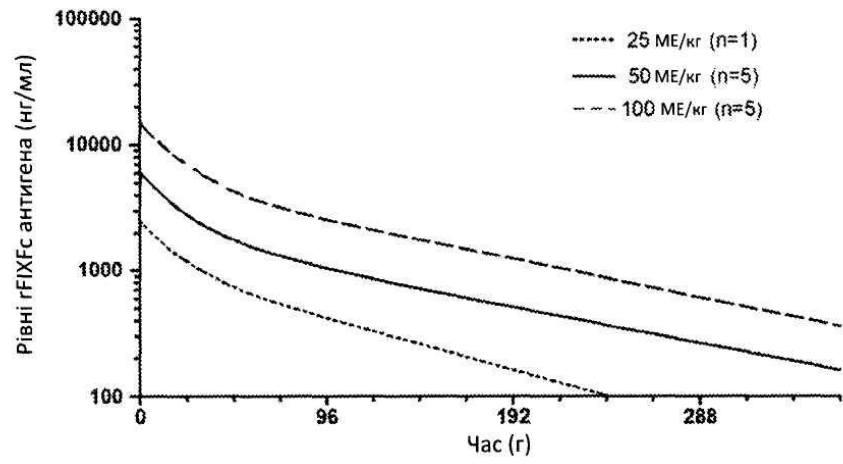
Фіг. 4



Фіг. 5

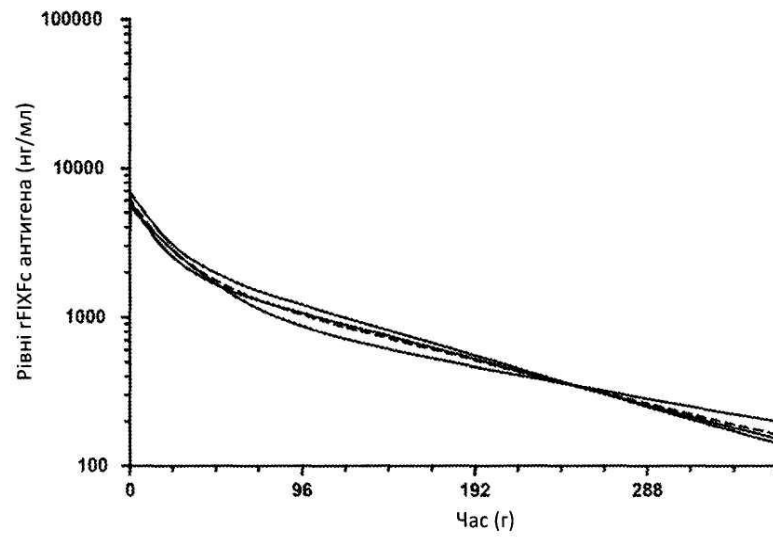


Фіг. 6

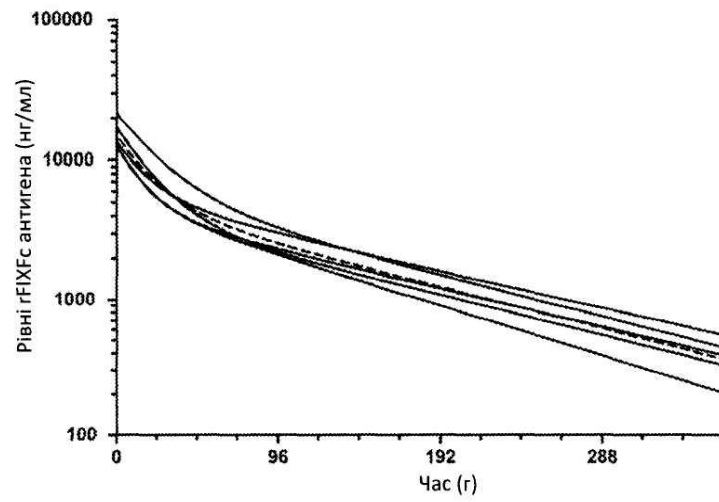


Фіг. 7

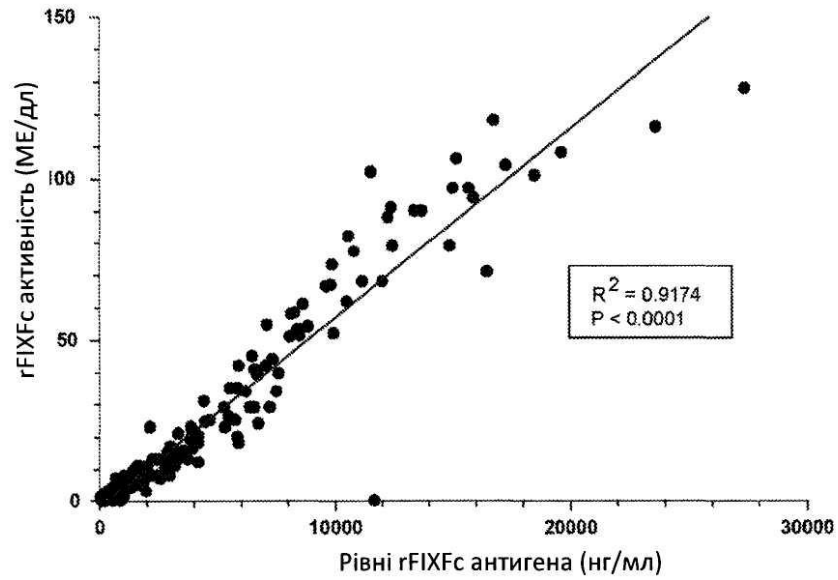
A



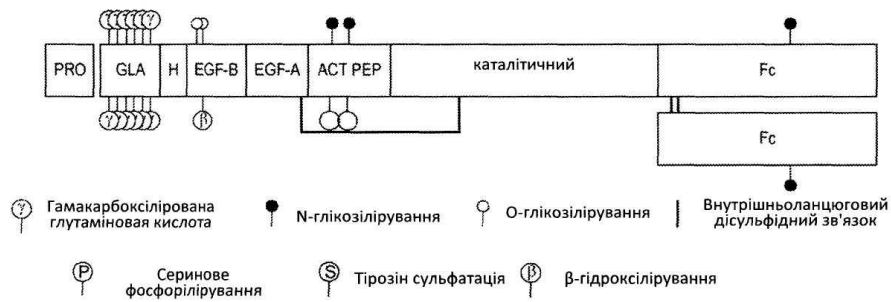
B



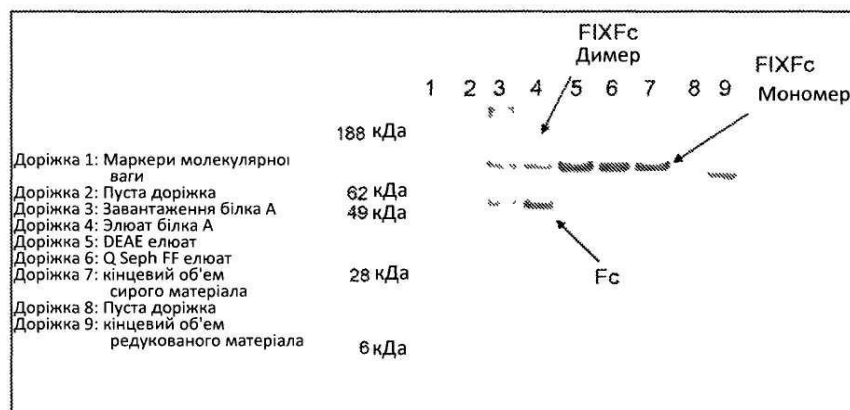
Фіг. 8



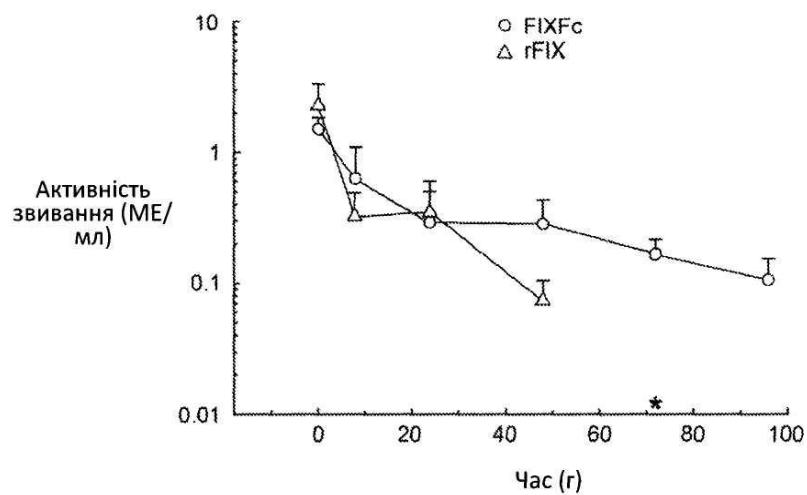
Фіг. 9



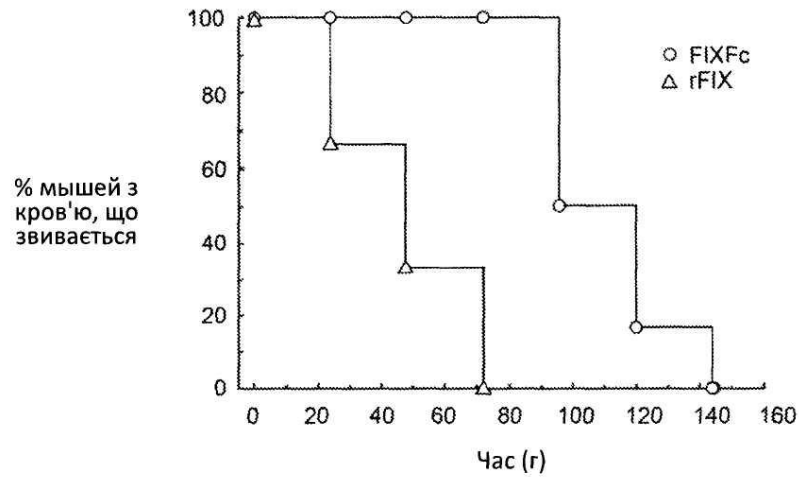
Фіг. 10



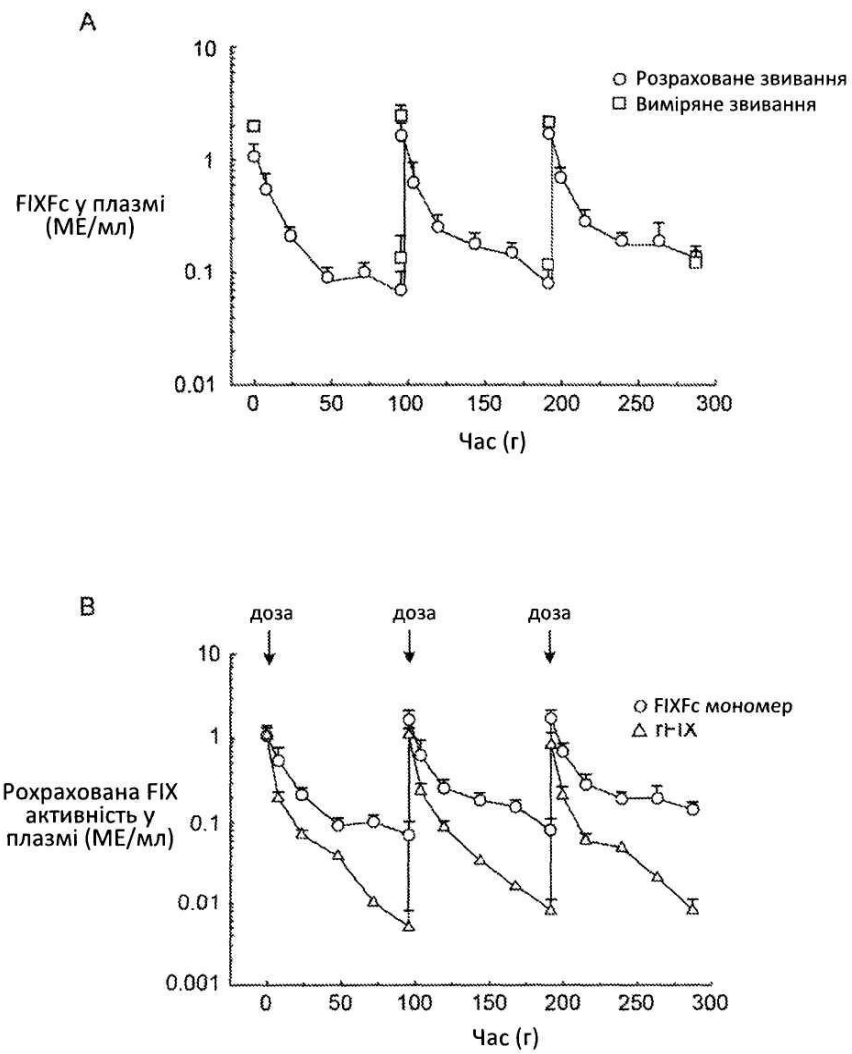
Фіг. 11



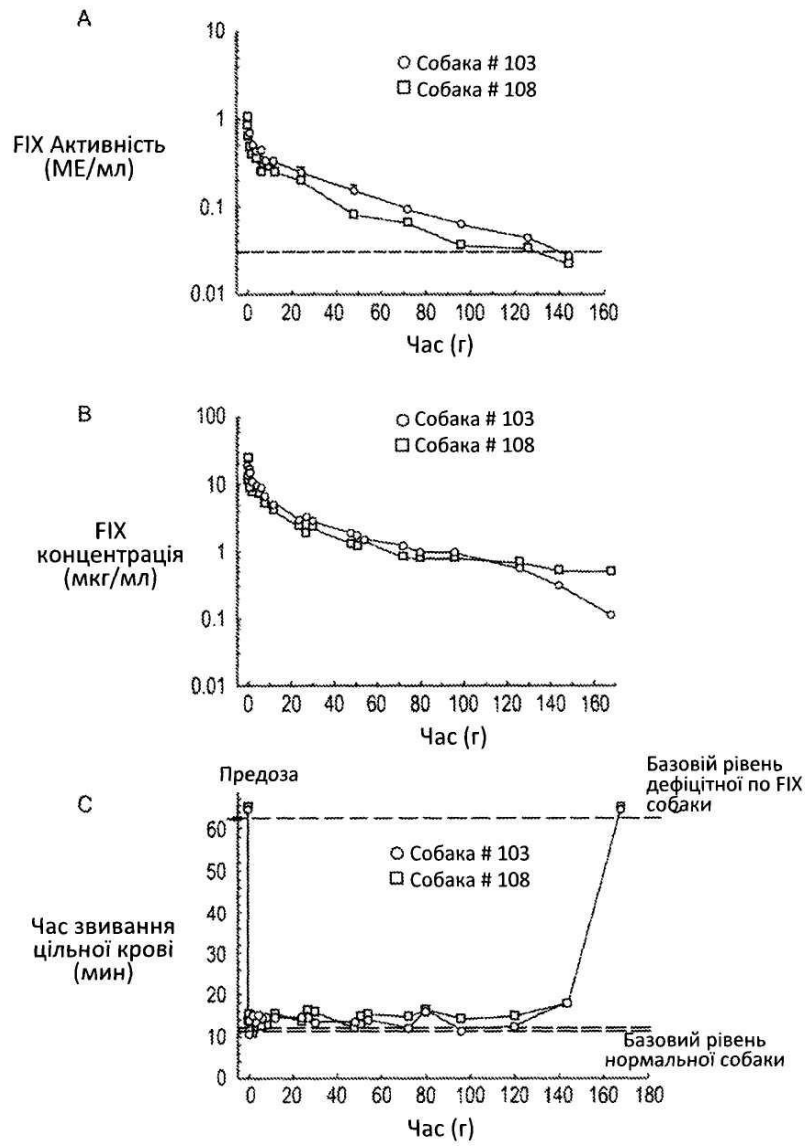
Фіг. 12



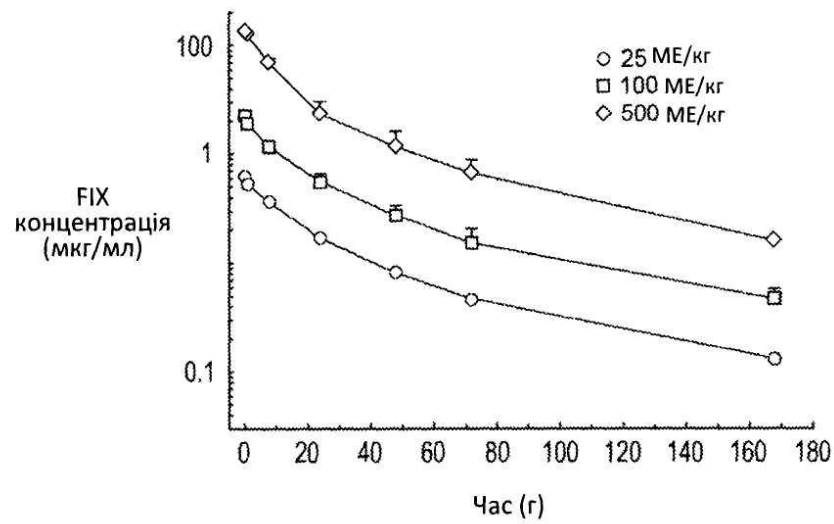
Фіг. 13



Фіг. 14

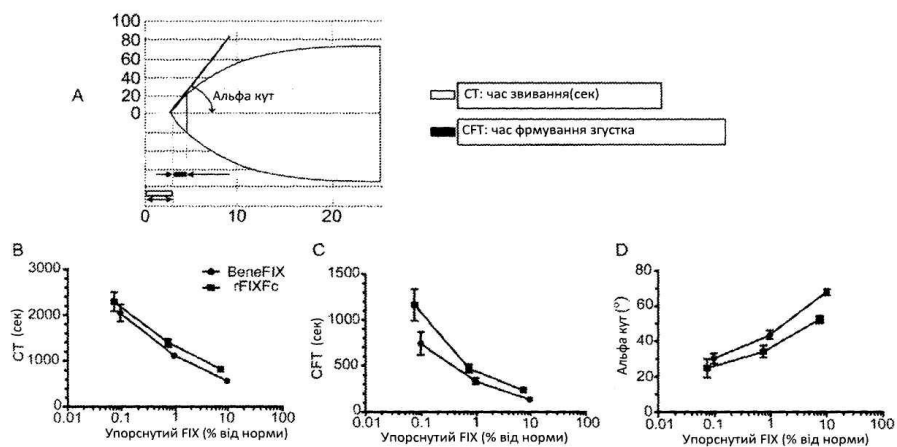


Фіг. 15

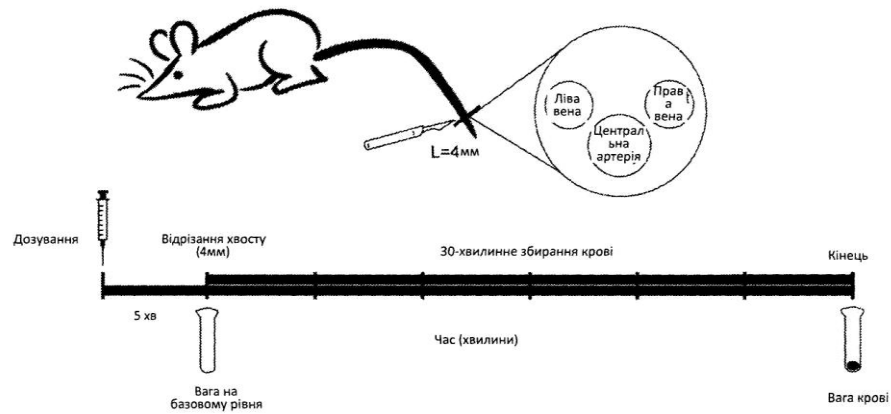


Фіг. 16

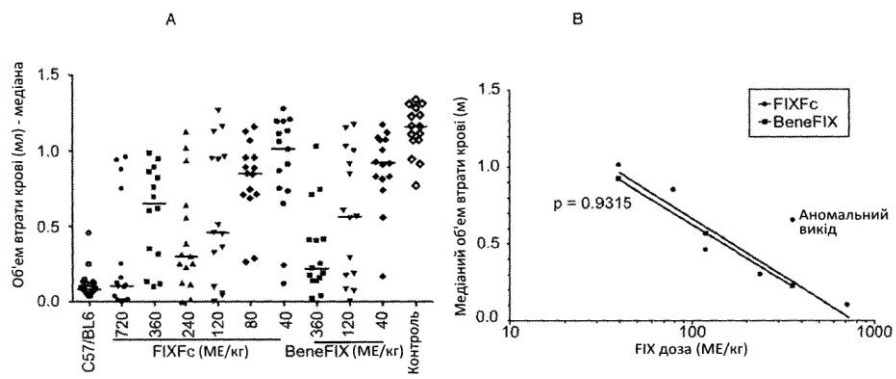
Параметри ROTEM



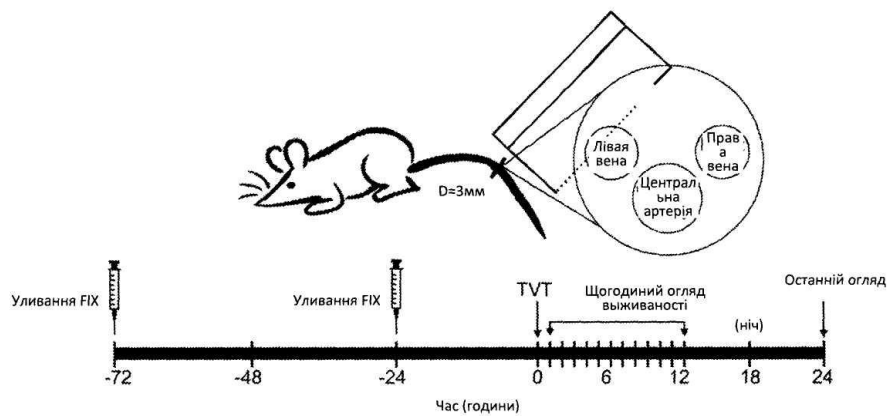
Фіг. 17



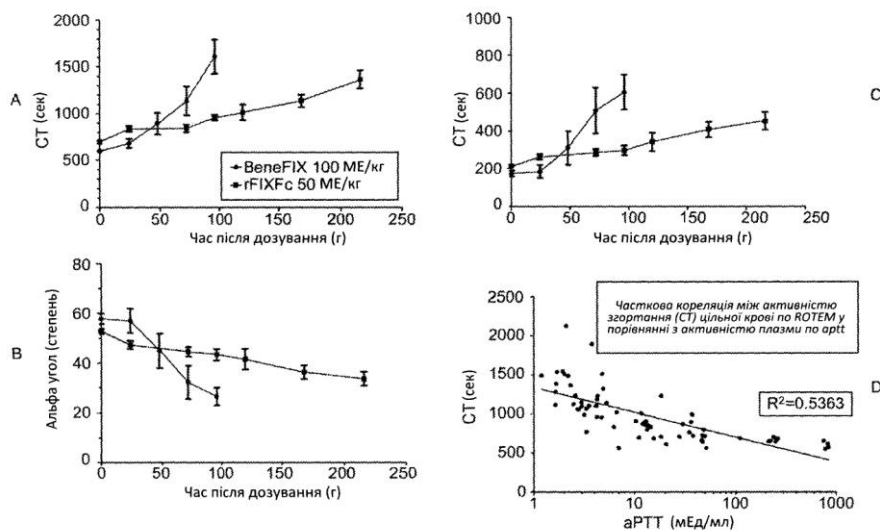
Фіг. 18



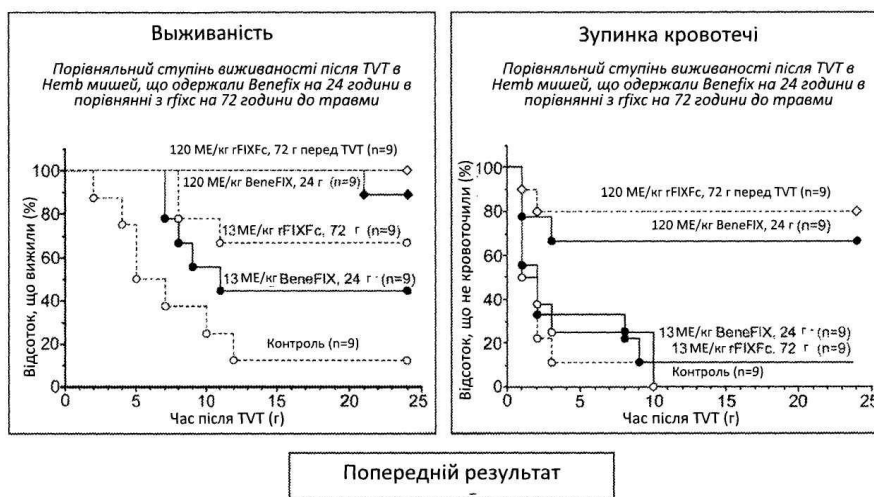
Фіг. 19



Фіг. 20

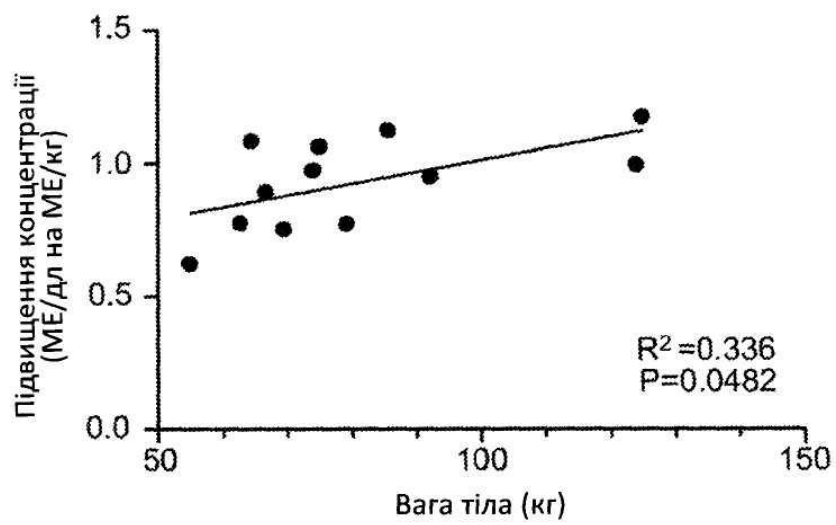


Фіг. 21

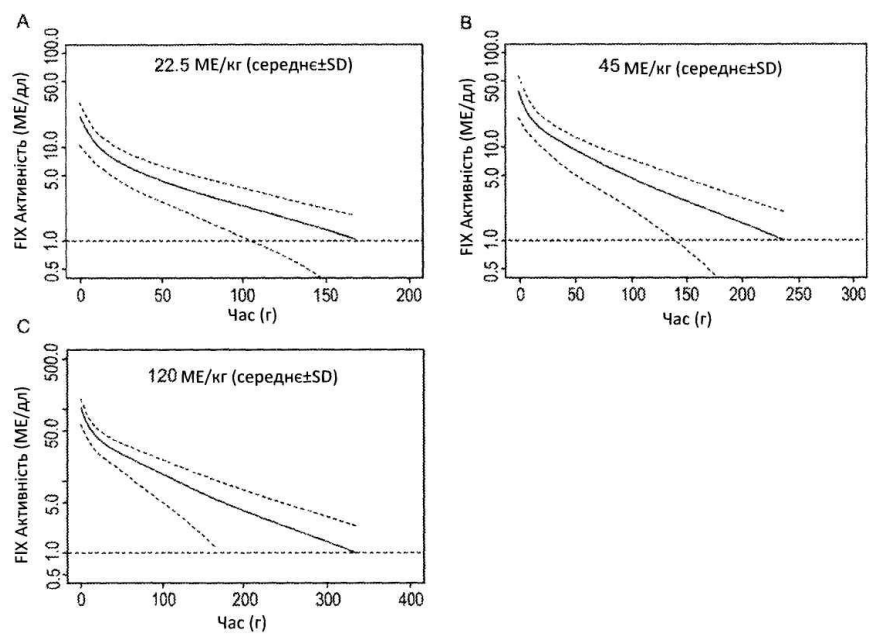


Попередній результат

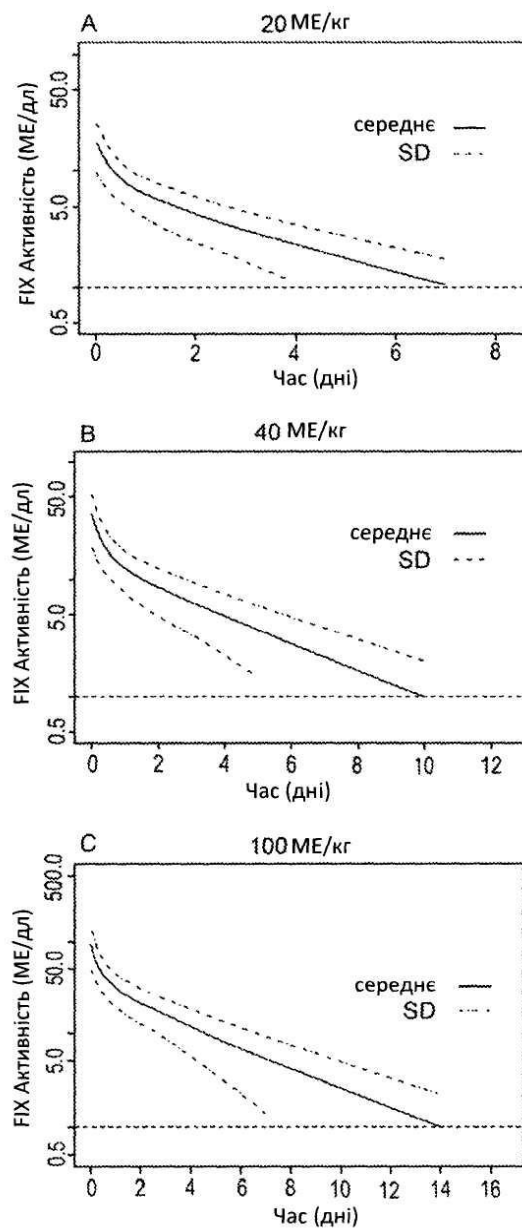
Фіг. 22



Фіг. 23



Фіг. 24



Фіг. 25

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601