

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490325** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.05.30**

(51) Int. Cl. *A61K 38/37* (2006.01)  
*A61K 47/10* (2017.01)  
*A61K 47/24* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.08.17**

---

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОЛЛОИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ГЕМОФИЛИИ А**

---

(31) **2111758.5**

(32) **2021.08.17**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2022/073013**

(87) **WO 2023/021115 2023.02.23**

(71) Заявитель:

**КАНТАБ БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
ПЭТЕНТС ЛИМИТЕД (МТ)**

(72) Изобретатель:

**Вольф-Гаррэвэй Ричард (GB)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к применению коллоидных частиц для лечения гемофилии А у ранее не получавших лечение пациентов или пациентов, получавших минимальное лечение фактором VIII (FVIII). Изобретение также относится к композициям, способам, наборам и лекарственным формам, содержащим коллоидные частицы для лечения гемофилии А у ранее не получавших лечение пациентов или пациентов, получавших минимальное лечение фактором VIII (FVIII).

**A1**

**202490325**

**202490325**

**A1**

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОЛЛОИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ  
ГЕМОФИЛИИ А

Настоящее изобретение относится к применению коллоидных частиц для лечения  
5 гемофилии А у ранее не получавших лечение пациентов или пациентов, получавших  
минимальное лечение фактором VIII (FVIII). Коллоидная частица содержит первый и второй  
амфипатический липид, причем второй амфипатический липид может представлять собой  
фосфолипидный фрагмент (группу), дериватизированный биосовместимым гидрофильным  
10 полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Изобретение также относится к композициям,  
способам, наборам и лекарственным (дозированным) формам, содержащим коллоидные  
частицы.

Коагуляционный каскад, который приводит к свертыванию крови, представляет собой  
15 многоступенчатый процесс, включающий множество различных белков и факторов в  
сочетании с регуляторными механизмами по типу обратной связи, которые обеспечивают  
безопасное образование сгустка крови в случае травмы. При нарушениях крови, таких как  
гемофилия, один или более из этих факторов могут быть дефектными или отсутствовать, что  
приводит к образованию дефектных или некачественных сгустков.

20 При гемофилии А фактор свертывания крови VIII (FVIII) отсутствует (тяжелая гемофилия) или  
находится на низком уровне (умеренная и легкая гемофилия).

FVIII является ключевым белком во «внутреннем» пути коагуляционного каскада, который при  
активации до FVIIIa объединяется с FIXa с образованием внутреннего «теназного» комплекса,  
25 который ускоряет превращение FX в FXa, который участвует в превращении протромбина в  
тромбин, который превращает фибриноген в фибрин, который образует сгусток крови.

Преобразование FX в FXa также может быть опосредовано «внешним» путем инициации.  
Образование внешнего теназного комплекса тканевого фактора (TF) и FVIIa (TF-FVIIa)  
30 инициирует коагуляционный каскад, что приводит к выработке тромбина, который также  
катализирует активацию FVIII до FVIIIa. Однако внешний путь менее эффективен, чем  
внутренний путь.

В отсутствие FVIII коагуляционный каскад протекает намного медленнее, поскольку каскаду  
35 приходится полагаться только на внешний путь, чтобы катализировать превращение FX в FXa.

При отсутствии эндогенного FVIII распространенной практикой является введение  
замещающего FVIII, полученного из плазмы или рекомбинантного, пациенту для  
восстановления у него способности к свертыванию крови. У пациентов могут вырабатываться  
40 антитела (ингибиторы) либо к экзогенному FVIII (врожденная гемофилия А — ВГА), либо к их

собственному FVIII (приобретенная гемофилия А — ПГА). Наличие ингибиторов снижает эффективность лечения пациентов с помощью экзогенного FVIII, поскольку этот белок связывается, нейтрализуется и быстро выводится из кровотока ингибиторным (ингибирующим) антителом, что делает профилактическое лечение замещающим

5 человеческим FVIII очень трудным или обычно невозможным. Неоптимальное количество FVIII означает, что даже если сгусток в принципе может быть образован, он образуется медленно или после образования имеет низкое качество и быстро разрушается.

В настоящее время существует два основных способа борьбы с выработкой ингибиторов:

10 применение индукции толерантности для элиминации ингибиторов (ITI) или применение препаратов обходного действия. При ITI применяют большие повторные дозы FVIII в течение нескольких месяцев, чтобы вызвать толерантность иммунной системы к FVIII с целью позволить пациенту вернуться к нормальному режиму дозирования. Данная терапия не всегда эффективна, и повторные инъекции высоких доз FVIII в течение нескольких месяцев являются

15 как неприятными для пациента, так и чрезвычайно дорогостоящими, что является значительным финансовым бременем для системы здравоохранения.

Препараты обходного действия позволяют избежать проблему ингибиторов, полностью «обходя» фазу амплификации. Эти способы терапии могут просто усиливать внешний путь

20 посредством подачи дополнительного FVIIa (например, NovoSeven) или могут поставлять смесь активных и инактивированных факторов, которые усиливают каскад в отсутствие FVIII, например, ФЕЙБА (FEIBA, смесь FVIIa, FIX, FIXa, FX, FXa, протромбина и тромбина). В более поздних разработках попытались заменить роль FVIIIa в объединении FIXa и FX с помощью применения биспецифического антитела.

25 Применение замещающего FVIII для лечения либо врожденной гемофилии А, либо приобретенной гемофилии А очень хорошо зарекомендовало себя в клинической практике. Однако эффективность таких продуктов ограничена из-за наличия ингибиторных антител, присутствующих у некоторых пациентов, что снижает эффективность экзогенно доставляемого фактора VIII. Ингибиторы появляются у 25–35% страдающих врожденной

30 гемофилией А («пациенты с ингибиторной формой заболевания») в ответ на экзогенный FVIII, который они получают; при приобретенной гемофилии А заболевание возникает по мере выработки у пациента ингибиторов к его собственному FVIII из-за аутоиммунной реакции.

35 Молекула FVIII дикого типа содержит 2332 аминокислоты, организованные в 6 доменов: А1-А2-В-А3-С1-С2. Вместе домены А1-А2-В содержат «тяжелую цепь» (HC), а домены А3-С1-С2 содержат «легкую цепь» (LC), и эти цепи соединены нековалентно. В живом организме FVIII обычно ассоциирует в кровотоке с фактором Виллебранда (ФВ). ФВ облегчает транспортировку FVIII и защищает его от преждевременной инактивации и элиминации

40 (Mannucci, P.M. et al. (2014) Novel investigations on the protective role of the FVIII/WWF complex

in inhibitor development. Haemophilia. 20(suppl. 6), 2-16). Ассоциация с ФВ также связана со снижением иммуногенности, эффективностью в присутствии ингибиторов и полезностью в лечении путем индукции иммунологической толерантности. В исследовании SIPPET (Peyvandi, F. et al. (2016) A randomized trial of Factor VIII and neutralizing antibodies in Hemophilia A, N Engl J Med. 374, 2054-64) было показано, что применение коммерческих концентратов полученного из плазмы FVIII (pdFVIII), содержащих ФВ, является менее иммуногенным, чем применение концентратов рекомбинантного FVIII (rFVIII). Снижение иммуногенности концентратов pdFVIII связано с шапероном ФВ, который, как полагают, или маскирует критические эпитопы на молекуле FVIII, и/или предотвращает его эндоцитоз дендритными

5 A, N Engl J Med. 374, 2054-64) было показано, что применение коммерческих концентратов полученного из плазмы FVIII (pdFVIII), содержащих ФВ, является менее иммуногенным, чем применение концентратов рекомбинантного FVIII (rFVIII). Снижение иммуногенности концентратов pdFVIII связано с шапероном ФВ, который, как полагают, или маскирует критические эпитопы на молекуле FVIII, и/или предотвращает его эндоцитоз дендритными

10 клетками (Astermark, J. (2015) FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. Blood. 125(13), 2045-51). С рекомбинантными молекулами FVIII также связана дополнительная сложность, так как большинство этих молекул не гуманизированы и продуцируются в клеточных линиях, отличных от человеческих, что приводит к присутствию у них эпитопов гликанов, отличных от человеческих и потенциально повышающих их иммуногенность.

15 Наиболее частым побочным эффектом лечения гемофилии остается выработка ингибиторов к этим эпитопам в FVIII (Van den Berg et al. (2020). ITI treatment is not a first-choice in children with hemophilia A and low-responding inhibitors: Evidence from a PedNet study. Coagulation and Fibrinolysis. 120, 1166-1172). Риск высок у ранее не получавших лечение пациентов (РНЛП), с

20 общей частотой возникновения до 40% (там же), вследствие чего у этих пациентов инактивируется действие FVIII, и для них требуются альтернативные и дорогостоящие меры помощи. У некоторых пациентов устранить ингибиторы может применение лечения путем индукции иммунологической толерантности, длительного и дорогостоящего способа, но этот способ срабатывает не у всех пациентов, что не позволяет им применять заместительную

25 терапию FVIII. Риск выработки ингибитора является самым высоким в течение первых 20 дней воздействия (ДВ) замещающего FVIII и сохраняется до 75 ДВ (Liesner, R.J. et al. (2021) Simoctocog alfa (Nuwiq™) in previously untreated patients with severe haemophilia A: final results of the NuProtect study. Thromb Haemost. online). Пациенты должны находиться под наблюдением на предмет выработки ингибиторов в течение этого периода.

30 Очевидно, что было бы предпочтительно, если бы эти ранее не получавшие лечение пациенты могли лечиться с помощью терапии FVIII, вероятность иммуногенности которой с самого начала была бы очень низкой, чтобы уменьшить риск развития ингибиторов на любом этапе.

35 Следовательно, существует потребность в неиммуногенной заместительной терапии FVIII, которая снижает риск развития ингибиторов на любом этапе.

40 Таким образом, в настоящем изобретении предложены пегилированные коллоидные частицы для применения в лечении гемофилии А для снижения риска выработки ингибиторов у ранее

не получавших лечение и получавших минимальное лечение пациентов при лечении с помощью FVIII путем комбинации экранирования эпитопов и продления периода полувыведения.

5 Было обнаружено, что пегилированные липосомы, по-видимому, предотвращают образование антител к FVIII в моделях со склонностью к выработке ингибиторов, а также позволяют уменьшать дозу/интервал между введениями.

10 Это обеспечивает более безопасный способ лечения ранее не получавших лечение пациентов (РНЛП) и пациентов, получавших минимальное лечение (ППМЛ — менее 50 дней воздействия (ДВ) в рамках терапии фактором VIII (FVIII)).

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 В настоящем изобретении предложены композиции, способы, наборы и лекарственные формы, содержащие коллоидную частицу, для лечения пациентов с гемофилией с дефицитом FVIII, и у которых отсутствуют ингибиторы FVIII. Указанные композиции, способы, наборы и лекарственные формы могут дополнительно необязательно содержать неионное поверхностно-активное вещество и/или FVIII.

20 В первом аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая коллоидную частицу, содержащую (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ), причем указанный второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером, для применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил 25 менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

30 Биосовместимый гидрофильный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиалкиловых эфиров, полимолочных кислот и полигликолевых кислот, предпочтительно биосовместимый гидрофильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Дальтон, предпочтительно приблизительно 2000 Дальтон или приблизительно 5000 Дальтон.

35 Второй амфипатический липид может представлять собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ), такой как N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ2000) или N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ5000).

40

Фосфатидилхолин (ФХ) может представлять собой 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ).

5 Первый амфипатический липид и второй амфипатический липид могут находиться в молярном соотношении от 90 до 110 : от 10 до 1, или от 90 до 99 : от 10 до 1, например, 100 : 3 или 97 : 3.

10 Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) неионное поверхностно-активное вещество. Неионное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитана, полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтиленлаурилового эфира. Неионное поверхностно-активное вещество может представлять собой полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат. Коллоидная частица может содержать первый амфипатический липид и второй амфипатический липид в соотношении с 15 неионным поверхностно-активным веществом от 30 : 1 до 2 : 1 (мас./мас.) ({первый амфипатический липид + второй амфипатический липид} : {неионное поверхностно-активное вещество}).

20 Первый амфипатический липид ко второму амфипатическому липиду к неионному поверхностно-активному веществу могут находиться в соотношении от 10 до 40 : 1 : от 0 до 4 (мас./мас.) ({первый амфипатический липид} : {второй амфипатический липид} : {неионное поверхностно-активное вещество}).

25 Композиция может дополнительно содержать молекулу фактора VIII (FVIII). Коллоидная частица и молекула фактора VIII (FVIII) могут находиться в стехиометрическом соотношении от 1 до 90 : 1, например, от 10 до 20 : 1 или от 5 до 10 : 1.

Гемофилия А может представлять собой врожденную гемофилию А (ВГА) или приобретенную гемофилию А (ПГА).

30 Композиция может дополнительно содержать терапевтически активное соединение. Композиция также может дополнительно содержать вспомогательное вещество, разбавитель и/или адъювант.

35 Субъект может представлять собой пациента детского возраста. Субъект также мог не получать терапию FVIII.

40 Композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в водной суспензии, готовой к применению, или композиции могут быть приготовлены в виде лиофилизированного состава. Лيوфилизированные составы согласно настоящему изобретению можно поставлять в виде отдельных лекарственных форм вместе с подходящим разбавителем, адъювантом или

вспомогательным веществом, например, физиологически приемлемым буфером. Как описано в настоящей заявке, такие композиции могут дополнительно содержать фактор VIII в виде отдельной лекарственной формы или в составе коллоидных частиц, описанных в настоящей заявке.

5

Во втором аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения гемофилии А у субъекта, включающий стадию введения композиции, содержащей коллоидную частицу. Указанная коллоидная частица содержит (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ). Второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

10

15

Биосовместимый гидрофильный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиалкиловых эфиров, полимолочных кислот и полигликолевых кислот, предпочтительно биосовместимый гидрофильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Дальтон, предпочтительно приблизительно 2000 Дальтон или приблизительно 5000 Дальтон.

20

Второй амфипатический липид может представлять собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ), такой как N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ2000) или N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ5000).

25

Фосфатидилхолин (ФХ) может представлять собой 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ).

30

Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) неионное поверхностно-активное вещество.

35

Композиция для способа может дополнительно содержать молекулу фактора VIII (FVIII). В альтернативном варианте способ может включать дополнительную стадию отдельного или последовательного введения композиции, содержащей молекулу фактора VIII (FVIII).

Гемофилия А может представлять собой врожденную гемофилию А (ВГА) или приобретенную гемофилию А (ПГА).

40

Субъект может представлять собой пациента детского возраста. Субъект также мог не получать терапию FVIII.

- 5 В третьем аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий (i) композицию, содержащую коллоидную частицу, и (ii) композицию, содержащую молекулу фактора VIII (FVIII), для применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII). Указанная коллоидная частица содержит (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ). Второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером.
- 10
- 15 Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) неионное поверхностно-активное вещество.

- В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий (i) композицию, содержащую коллоидную частицу, и (ii) композицию, содержащую молекулу фактора VIII (FVIII), для отдельного, одновременного или последовательного применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII). Указанная коллоидная частица содержит (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ). Второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером.
- 20
- 25

- Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) неионное поверхностно-активное вещество.
- 30

- В пятом аспекте настоящего изобретения предложена лекарственная форма фармацевтической композиции, содержащей коллоидную частицу, содержащую (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ), причем указанный второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером, для применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).
- 35
- 40

Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) неионное поверхностно-активное вещество.

5 Настоящее изобретение подходит для пациентов с гемофилией с дефицитом FVIII, у которых отсутствуют ингибиторы FVIII.

В одном варианте реализации способ предназначен для лечения ранее не получавших лечение пациентов (РНЛП), или пациентов, получавших минимальное лечение (ППМЛ), с легкой, умеренной или тяжелой формой гемофилии А, чтобы свести к минимуму риск выработки ингибиторов у пациентов, ранее не получавших лечения.

В другом варианте реализации указанный способ предназначен для лечения пациентов, у которых ранее было показано, что они склонны к выработке ингибиторов, но в настоящее время ингибиторы у них отсутствуют; способ позволяет предотвратить рецидив выработки ингибиторов.

В одном из вариантов реализации способ предназначен для лечения пациентов, у которых ранее вырабатывались ингибиторы, но после курса терапии путем индукции иммунологической толерантности в настоящее время ингибиторы отсутствуют; способ позволяет предотвратить рецидив выработки ингибиторов.

В другом варианте реализации указанный способ предназначен для лечения пациентов, проходящих терапию путем индукции иммунологической толерантности, с целью предотвращения дальнейшей стимуляции иммунной системы.

В одном из вариантов реализации указанный способ предназначен для лечения пациентов с легкой, умеренной или тяжелой формой гемофилии А, у которых еще не вырабатывались ингибиторы, и которые желают снизить риск выработки ингибиторов в ответ на проводимую им заместительную терапию с помощью FVIII.

#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены композиции, способы, наборы и лекарственные формы, содержащие коллоидную частицу, для применения в лечении гемофилии А у субъекта, причем указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

Терапия фактором VIII (FVIII) может представлять собой заместительную терапию фактором VIII (FVIII), таким как полученный из плазмы или рекомбинантный FVIII, у пациента/субъекта для восстановления у них способности к свертыванию. В случаях, когда у

пациентов/субъектов выработались ингибиторы, указанный пациент/субъект может получать терапию, такую как терапия препаратами «обходного действия» или терапия с индукцией толерантности для элиминации ингибиторов (ITI). Препараты обходного действия включают FVIIa (например, NovoSeven) или смесь активных и инактивированных факторов, например, 5 ФЕЙБА (смесь FVIIa, FIX, FIXa, FX, FXa, протромбина и тромбина). Для индукции толерантности для элиминации ингибиторов (ITI) применяют большие повторные дозы FVIII в течение нескольких месяцев, чтобы индуцировать толерантность иммунной системы к FVIII.

Термины «ингибиторы» или «ингибиторные антитела к FVIII» относятся к антителам, которые 10 также известны под взаимозаменяемыми терминами «ингибиторные антитела» или «нейтрализующие антитела к FVIII». Указанные антитела могут представлять собой аутоантитела к эндогенному FVIII или антитела к экзогенному FVIII.

В соответствии с первым аспектом, описанным выше, коллоидная частица содержит (i) 15 первый амфипатический липид и (ii) второй амфипатический липид. Первый амфипатический липид представляет собой фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент. Подходящим примером фосфатидилхолинового (ФХ) фрагмента может являться 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ). Второй амфипатический липид представляет собой фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), 20 фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ). Подходящим примером фосфатидилэтаноламина (ФЭ) может являться 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанол-35 амин (ДСФЭ). Липид аминокпропандиол дистеароил (ДС) представляет собой незаряженный липополимер с карбаматной связью, который также является амфипатическим липидом. Другие примеры фосфатидилэтаноламина (ФЭ) включают ДПФЭ, ДМФЭ и ДОФЭ.

25 Коллоидные частицы согласно настоящему изобретению обычно имеют форму липидных везикул или липосом и хорошо известны специалистам в данной области техники. Коллоидные частицы в настоящем описании включают липосомы и липидные везикулы, если в контексте нет других указаний.

30 Второй амфипатический липид представляет собой фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером.

Биосовместимый гидрофильный полимер предназначен для стерической стабилизации 35 коллоидной частицы, в результате чего он предотвращает слияние коллоидной частицы *in vitro* и позволяет коллоидной частице избежать адсорбции ретикулоэндотелиальной системой *in vivo*. Биосовместимый гидрофильный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиалкиловых эфиров, полимолочных кислот и полигликолевых кислот. Биосовместимый гидрофильный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль 40 (ПЭГ). Полиэтиленгликоль может быть разветвленным или неразветвленным.

Биосовместимый полимер может иметь молекулярную массу от приблизительно 100 до приблизительно 10 000 Да, предпочтительно от приблизительно 2000 до приблизительно 5000 Да, с предпочтительными значениями приблизительно 100 Да, 250 Да, 350 Да, 550 Да, 750 Да, 1000 Да, 1500 Да, 2000 Да, 2500 Да, 3000 Да, 3500 Да, 4000 Да, 4500 Да, 5000 Да, 5500 Да, 6000 Да, 6500 Да, 7000 Да, 7500 Да, 8000 Да, 8500 Да, 9500 Да и 10 000 Да. Подходящим примером фосфолипида, дериватизированного биосовместимым гидрофильным полимером, может быть N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ), такой как N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ(2000)) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ5000).

Первый амфипатический липид и второй амфипатический липид могут быть предложены в молярном соотношении от 90 до 110 : от 10 до 1, от 90 до 100 : от 10 до 1, от 90 до 99 : от 10 до 1, от 93 до 99 : от 7 до 1, от 95 до 99 : от 5 до 1, предпочтительно 100 : 3, 100 : 3, 99 : 3, 98 : 3, 97 : 3, 96 : 3 или 95 : 3. Молярное соотношение 97,3 также может быть выражено как молярное соотношение 32,4 : 1, аналогично, молярное соотношение 100 : 3 может быть выражено как молярное соотношение 33,2 : 1. Соотношение первого амфипатического липида и второго амфипатического липида также может быть выражено как соотношение масс, например, от 1 : 1 до 20 : 1 (мас./мас.), предпочтительно от 2 : 1 до 12 : 1 (мас./мас.) или от 4 : 1 до 9 : 1 (мас./мас.), например, 4 : 1, 5 : 1, 6 : 1, 9 : 1 или 12 : 1 (мас./мас.). Соответственно, композиция может содержать коллоидную частицу, состоящую из смеси пальмитоил-олеоил-фосфатидилхолина (ПОФХ) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ) в молярном соотношении (ПОФХ : ДСФЭ) от 90 до 99 : от 10 до 1, от 93 до 99 : от 7 до 1, от 95 до 99 : от 5 до 1, предпочтительно 97 : 3. Соотношение, выраженное в виде соотношения масс, может составлять, например, от 1 : 1 до 20 : 1 (мас./мас.), предпочтительно от 2 : 1 до 12 : 1 (мас./мас.), например, 4 : 1, 5 : 1, 6 : 1, 9 : 1 или 12 : 1 (мас./мас.).

В одном примере коллоидная частица может состоять из 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоля-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ(2000)) в молярном соотношении 97 : 3 или соотношении 9 : 1 (мас./мас.).

Коллоидная частица может иметь средний размер частиц в диапазоне от 0,05 до 0,03 мкм в диаметре, предпочтительно приблизительно 0,1, 0,15, 0,2 или 0,25 микрон (мкм). Средний размер частиц может составлять от 100 до 130 нанометров (нм), предпочтительно от 110 до 120 нм, от 112 до 118 нм, от 150 до 170 нм, от 155 до 165 нм, более предпочтительно 110, 112, 114, 116, 118, 120, 160, 162, 164, 166, 168 или 170 нм.

Средний размер частиц может быть измерен с помощью Malvern Zetasizer Ultra ZSU 5700. Этот прибор определяет размер частиц по светорассеянию, при этом обратное рассеяние от

лазерного света, попадающего в образец и ударяющегося о частицы, детектируется под углом 173° (угол 173° соответствует почти обратному направлению на себя, и отсюда термин обратное рассеяние). Броуновское движение частиц заставляет свет рассеиваться с разной интенсивностью. Поскольку скорость броуновского движения зависит от размера частиц,  
5 размер частиц можно определить с помощью соотношения Стокса — Эйнштейна.

Средний размер частиц соответствует среднему диаметру коллоидной частицы. Коэффициент полидисперсности (PDI), указанный в отношении измерений размера частиц, соответствует мере распределения вокруг среднего диаметра коллоидной частицы.  
10 Например, в настоящем изобретении коэффициент полидисперсности может составлять максимум 0,2, предпочтительно 0,15, 0,12, 0,1 или 0,5.

PDI рассчитывается как квадрат отношения стандартное отклонение/среднее, т. е.  $PDI = (s/m)^2$ .  
15

Из среднего размера частиц и коэффициента полидисперсности можно рассчитать стандартное отклонение. Удвоенное стандартное отклонение облегчает расчет 95% доверительных интервалов вокруг размера частиц, т. е. диапазона, в котором находятся 95% коллоидных частиц в образце.  
20

Подходящий 95% доверительный интервал среднего размера частиц может составлять от 50 до 500 нм, предпочтительно от 50 до 290 нм, от 50 до 285 нм, от 65 до 265 нм, от 65 до 260 нм, от 65 до 180 нм, от 65 до 175 нм, от 65 до 170 нм, от 65 до 165 нм, от 65 до 160 нм, более предпочтительно от 65 до 173 нм, от 64 до 161 нм, от 65 до 263 нм или от 54 до 282 нм.  
25

Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) поверхностно-активное вещество, такое как неионное поверхностно-активное вещество. Неионное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитана, полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтиленлаурилового эфира. Неионное  
30 поверхностно-активное вещество может представлять собой полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат (также известный как полисорбат 80 или Твин 80). Первый амфипатический липид и второй амфипатический липид относительно неионного поверхностно-активного вещества могут быть предложены в соотношении от 30 : 1 до 2 : 1 (мас./мас.), предпочтительно 25 : 1, 20 : 1, 16 : 1, 15 : 1, 14 : 1, 13 : 1, 12 : 1, 11 : 1, 10 : 1, 9 : 1,  
35 8 : 1 или 5 : 1 (мас./мас.) ({первый амфипатический липид + второй амфипатический липид} : {неионное поверхностно-активное вещество}). Выраженное в виде молярного соотношения, это соотношение может составлять, например, от 10 до 20 : 1, от 12 до 18 : 1, от 14 до 16 : 1, предпочтительно 14 : 1, 15 : 1 или 16 : 1. Концентрация поверхностно-активного вещества может составлять в массовом выражении от 0,25% до 5%, например, от 1% до 3%,  
40 от 1 до 2%, примерами некоторых значений могут являться 0,47%, 0,85% или 3,5%.

Неионное поверхностно-активное вещество может также быть пегилированным. Пегилированное неионное поверхностно-активное вещество может представлять собой

полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат (также известный как полисорбат 80 или Твин 80). Полиэтиленгликоль может быть разветвленным или неразветвленным. Биосовместимый полимер может иметь молекулярную массу от приблизительно 100 до приблизительно 10 000 Да, предпочтительно от приблизительно 2000 до приблизительно 5000 Да, с 5 предпочтительными значениями приблизительно 100 Да, 250 Да, 350 Да, 550 Да, 750 Да, 1000 Да, 1500 Да, 2000 Да, 2500 Да, 3000 Да, 3500 Да, 4000 Да, 4500 Да, 5000 Да, 5500 Да, 6000 Да, 6500 Да, 7000 Да, 7500 Да, 8000 Да, 8500 Да, 9500 Да и 10 000 Да.

10 Неионное поверхностно-активное вещество может быть ассоциировано с коллоидной частицей, включено в липидную двуслойную мембрану коллоидной частицы, включено во внешний слой липидной двуслойной мембраны коллоидной частицы или включено во внутренний слой липидной двуслойной мембраны коллоидной частицы.

15 Соответственно, первый амфипатический липид относительно второго амфипатического липида относительно неионного поверхностно-активного вещества могут быть предложены в соотношении от 2 до 10 : 1 : от 0 до 2, от 3 до 9 : 1 : от 0,5 до 1,5, от 4 до 9 : 1 : от 0,5 до 1 (мас./мас.), предпочтительно 9 : 1 : 0, 9 : 1 : 1, 4 : 1 : 0 или 4 : 1 : 0,5 (мас./мас.) ({первый амфипатический липид} : {второй амфипатический липид} : {неионное поверхностно-активное 20 вещество}). Выраженное в молярном соотношении это может быть, например, соотношение от 30 до 40 : 1 : от 0 до 5, от 30 до 35 : 1 : от 0 до 2,5, от 30 до 35 : 1 : от 0 до 2,5, предпочтительно 33 : 1 : 0, 33 : 1 : 2 или 32 : 1 : 3.

Композиция может дополнительно содержать молекулу фактора VIII (FVIII) или ее фрагмент. Если композиция содержит фрагмент фактора VIII, указанный фрагмент фактора VIII может 25 подходящим образом представлять собой активный фрагмент, в котором фрагмент сохраняет биологическую активность, или по существу ту же биологическую активность, что и нативная молекула фактора VIII. Например, один из таких активных фрагментов представляет собой фактор VIII с усеченным В-доменом. Кроме того, возможно, что композиция может содержать как нативный фактор крови, так и его фрагмент. Коллоидная частица и молекула фактора VIII 30 (FVIII) могут быть предложены в стехиометрическом соотношении от 1 до 90 : 1, предпочтительно от 2 до 90 : 1, от 5 до 85 : 1, от 6 до 10 : 1, от 7 до 8 : 1, от 7,5 до 20 : 1, от 10 до 80 : 1, от 10 до 15 : 1, от 10 до 16 : 1, от 10 до 20 : 1, от 13 до 19 : 1, от 15 до 16 : 1, от 15 до 75 : 1, от 20 до 70 : 1, от 25 до 65 : 1, от 30 до 60 : 1, от 35 до 55 : 1, от 40 до 50 : 1, например от 10 до 20 : 1 и от 5 до 10 : 1. При альтернативном выражении, коллоидная частица и 35 молекула фактора VIII (FVIII) могут быть предложены в стехиометрическом соотношении 1 : 1, 2 : 1, 5 : 1, 7,5 : 1, 10 : 1, 15 : 1, 16 : 1, 17 : 1, 18 : 1, 19 : 1, 20 : 1, 22 : 1, 25 : 1, 26 : 1, 27 : 1, 28 : 1, 29 : 1, 30 : 1, 35 : 1, 40 : 1, 45 : 1, 50 : 1, 55 : 1, 60 : 1, 65 : 1, 70 : 1, 75 : 1, 80 : 1, 85 : 1, 86 : 1, 90 : 1, например, 15,5 : 1, 13 : 1, 8 : 1, 7,7 : 1, 7 : 1. Более конкретно, для полноразмерных молекул FVIII стехиометрическое соотношение может составлять от 10 : 1 до 19 : 1 и 40 оптимально от 10 до 15 : 1 или от 5 до 10 : 1 и оптимально 7,5 : 1. Для молекул FVIII с

удаленным или усеченным бета-доменом диапазоны могут составлять от 13 до 19 : 1 и оптимально от 10 до 16 : 1 или от 6 до 10 : 1 и оптимально 8 : 1.

5 Не следуя какой-то определенной теории, существует предположение, что избыточные коллоидные частицы, присутствующие в композиции, находятся в количестве, достаточном для того, чтобы позволить свободным коллоидным частицам обратимо связываться с другими основными факторами крови (например, FVII и FIX в случае гемофилии A), которые вместе с количеством ассоциированного с частицами фактора VIII (FVIII) могут быть захвачены и обратимо связаны с тромбоцитами после введения, чтобы концентрировать факторы в 10 тромбоците и стимулировать внешний путь свертывания крови.

Фактор VIII может быть получен из любого подходящего источника и может представлять собой рекомбинантный белок, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК с применением молекулярно-биологических методик, или может быть синтезирован химически 15 или получен трансгенными методами в молоке млекопитающего, или фактор VIII может быть выделен из природных источников (например, очищен из плазмы крови). Предпочтительно фактор VIII представляет собой фактор VIII млекопитающего, такой как человеческий фактор VIII.

20 Факторы крови, такие как фактор VIII, характеризуются свойством поверхностной адгезии. Это необходимая особенность коагуляционного каскада, для которого требуется, чтобы ферменты и кофакторы прикреплялись к другим участникам каскада, к поверхности тромбоцитов и к ткани в месте повреждения. Особенно важно, чтобы сгусток крови оставался на месте травмы и не дрейфовал, вызывая опасный тромбоз. Это свойство представляет 25 собой проблему при составлении лекарственных средств, поскольку факторы крови, такие как фактор VIII, будут чрезмерно прикрепляться к любым стеклянным и пластиковым поверхностям. На практике этот эффект смягчается за счет широкого применения неионного поверхностно-активного вещества, такого как полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеатполисорбат (Tween® 80).

30 Для определения стехиометрического соотношения коллоидной частицы и молекулы фактора VIII (FVIII) необходимо выполнить следующий расчет. Сначала должно быть определено количество молекул FVIII на ME FVIII. Следует отметить, что масса FVIII варьирует в зависимости от варианта FVIII (например, полноразмерный по сравнению с 35 вариантом с удаленным  $\beta$ -доменом). Во-вторых, должно быть определено количество частиц на грамм коллоидной частицы. Наконец, соответствующим образом можно определить стехиометрическое соотношение. Далее следуют примеры расчетов с 35 ME/kg FVIII (как с удаленным бета-доменом, так и полноразмерным) и 22 мг/кг PEGlip:

#### 40 Пример расчета 1, rFVIII с удаленным бета-доменом

<b>FVIII, например Nuwiq</b>			
Удельная активность	9500	ME/мг	A
Масса 1 ME FVIII	0,105	мг	B = 1/A × 1000

	=	$1,05 \times 10^{-7}$	г	$C = B/1\ 000\ 000$
Молекулярная масса FVIII		170 000	г/моль	D
Молей в 1 МЕ		$6,19 \times 10^{-13}$	Моли	$E = C/D$
N(A)		$6,02 \times 10^{23}$	Молекулы/моль	F
Молекул FVIII на МЕ PEGLip		$3,73 \times 10^{11}$	Молекулы/МЕ	$G = E \times F$
		<b>ПОФХ</b>	<b>ДСФЭ</b>	
Масса 1 г твердого вещества PEGLip		0,9	0,1	г
Молекулярная масса		760,1	2748	г/моль
Моли/г твердого вещества PEGLip		$1,19 \times 10^{-3}$	$3,64 \times 10^{-5}$	Моли
		J1	J2	
Всего молей липидов		$1,22 \times 10^{-3}$		Моли
N(A)		$6,02 \times 10^{23}$		Молекулы/моль
N(общ.)		80 047		Липиды/поверхность
N(Lipo)		$9,18 \times 10^{15}$		Липосомы/г твердого вещества PEGLip
<b>Расчет соотношения</b>				
35 МЕ/кг FVIII с удаленным бета-доменом		$1,30 \times 10^{13}$		Молекулы
22 мг/кг PEGLip		$2,02 \times 10^{14}$		Липосомы
Соотношение		15 : 1		Липосомы : FVIII (с округлением)
				$O = G \times 35$
				$P = N \times 22$
				$Q = P/O$

5

**Пример расчета 2, полноразмерный rFVIII**

<b>FVIII, например Kogenate</b>				
Удельная активность		4000	МЕ/мг	A
Масса 1 МЕ FVIII		0,250	мг	$B = 1/A \times 1000$
	=	$2,50 \times 10^{-7}$	г	$C = B/1\ 000\ 000$
Молекулярная масса FVIII		265 000	г/моль	D
Молей в 1 МЕ		$9,43 \times 10^{-13}$	Моли	$E = C/D$
N(A)		$6,02 \times 10^{23}$	Молекулы/моль	F
Молекул FVIII на МЕ PEGLip		$5,68 \times 10^{11}$	Молекулы/МЕ	$G = E \times F$
		<b>ПОФХ</b>	<b>ДСФЭ</b>	
Масса 1 г твердого вещества PEGLip		0,9	0,1	г
Молекулярная масса		760,1	2748	г/моль
Моли/г твердого вещества PEGLip		$1,19 \times 10^{-3}$	$3,64 \times 10^{-5}$	Моли
		J1	J2	
Всего молей липидов		$1,22 \times 10^{-3}$		Моли
N(A)		$6,02 \times 10^{23}$		Молекулы/моль
N(общ.)		80 047		Липиды/поверхность
N(Lipo)		$9,18 \times 10^{15}$		Липосомы/г твердого вещества PEGLip
<b>Расчет соотношения</b>				
35 МЕ/кг FVIII с удаленным бета-доменом		$1,99 \times 10^{13}$		Молекулы
22 мг/кг PEGLip		$2,02 \times 10^{14}$		Липосомы
Соотношение		10 : 1		Липосомы : FVIII (с округлением)
				$O = G \times 35$
				$P = N \times 22$
				$Q = P/O$

Композиция может содержать дополнительное терапевтически активное соединение или молекулу, например, противовоспалительное лекарственное средство, анальгетик или антибиотик или другой фармацевтически активный агент, который может стимулировать или усиливать активность фактора VIII.

5

Указанная композиция может дополнительно содержать любое подходящее вспомогательное вещество, разбавитель и/или адъювант. Подходящие разбавители, такие как буферы, могут быть составлены с водорастворимой солью щелочного металла или щелочноземельного металла и подходящей кислотой. Подходящие буферные растворы могут включать, без

10 ограничения, аминокислоты (например, гистидин), соли неорганических кислот (например, кислоты, выбранной из группы, состоящей из лимонной кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, лимонной кислоты и фосфорной кислоты) и щелочных металлов или щелочноземельных металлов (например, соли натрия, соли магния, соли калия, соли лития или соли кальция, примерами которых служат хлорид натрия, фосфат натрия или цитрат

15 натрия). Примеры таких вспомогательных веществ, буферов и/или адъювантов включают фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), фосфат калия, фосфат натрия и/или цитрат натрия. Другими биологическими буферами могут являться буферные растворы PIPES, MOPS и др.

20 Подходящий водный цитратный буфер может представлять собой натрий-цитратный буфер или калий-цитратный буфер, например, 50 мМ натрий-цитратный буфер. Подходящий фосфатный буфер может представлять собой натрий-фосфатный буфер, например, 25 мМ натрий-фосфатный буфер.

25 Подходящие значения pH для композиции включают любые общепринятые значения pH для введения *in vivo*, такие как, например, от pH 5,0 до pH 9,0, предпочтительно от pH 6,7 до pH 7,4 или pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,2. Значение pH можно корректировать соответствующим образом с помощью подходящей кислоты или щелочи, например хлористоводородной кислоты.

30

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в водной суспензии, готовой к применению, или композиции могут быть приготовлены в виде лиофилизированного состава. Лيوфилизированные составы согласно настоящему изобретению можно поставлять в виде отдельных лекарственных форм вместе с подходящим разбавителем, адъювантом или

35 вспомогательным веществом, например, физиологически приемлемым буфером. Как описано в настоящей заявке, такие композиции могут дополнительно содержать фактор VIII в виде отдельной лекарственной формы или в составе коллоидных частиц, описанных в настоящей заявке. Как правило, для восстановления будет предоставлен флакон с лиофилизированным фактором VIII (FVIII) и отдельный флакон с раствором коллоидных частиц (PEGLip).

40

Коллоидные частицы могут храниться в виде суспензии с 9% (мас./об.) общих липидов в водном цитратном буфере, предпочтительно частицы могут храниться в виде суспензии с 7%, 6%, 5%, 4% (мас./об.) общих липидов. После того, как станет известна необходимая для пациента концентрация экзогенного фактора VIII (FVIII), нерасфасованный раствор при  
5 необходимости можно разбавить 50 мМ раствором цитрата натрия для коррекции концентрации коллоидных частиц таким образом, чтобы при добавлении фактора VIII (FVIII) получалось требуемое соотношение коллоидных частиц и молекул фактора VIII (FVIII).

Фактор VIII может быть полностью экзогенным и соединен с изобретением в состав перед  
10 инъекцией, например, в случае тяжелой гемофилии с ингибиторами, для применения при которой он может быть получен либо из концентратов плазмы, либо рекомбинантным путем. В качестве альтернативы, если пациент сохраняет некоторую способность к самостоятельной выработке фактора VIII (например, у пациентов с легкой или умеренной степенью тяжести гемофилии или у пациентов с приобретенной гемофилией), будет вводиться меньшее  
15 количество экзогенного фактора VIII или его вообще не будут вводить.

Не следуя какой-то определенной теории, существует предположение, что избыточные коллоидные частицы, присутствующие в композиции, находятся в количестве, достаточном для того, чтобы позволить свободным коллоидным частицам обратимо связываться с другими  
20 основными факторами крови (например, FVII и FIX в случае гемофилии A), которые вместе с количеством ассоциированного с частицами фактора VIII (FVIII) могут быть захвачены и обратимо связаны с тромбоцитами после введения, чтобы концентрировать факторы в тромбоците и стимулировать внешний путь свертывания крови.

После инъекции коллоидная частица обратимо связывается с поверхностью тромбоцитов крови и сливается с мембраной других клеток. Если частицы коллоидных частиц уже связаны с экзогенным фактором VIII, это концентрирует фактор VIII на поверхности тромбоцита, при этом некоторое количество, возможно, фагоцитируется в тромбоциты или ассоциировано с  
25 либо находится внутри образующихся TF-содержащих прокоагулянтных микрочастиц, что защищает белок от ингибиторов, а также нормальных механизмов элиминации, например, посредством LRP-1, обеспечивая более длительный период полувыведения белка. У пациентов с умеренной или легкой гемофилией коллоидные частицы также захватывают  
30 любой циркулирующий фактор VIII, концентрируя его на тромбоцитах или внутри них, либо в возникающих TF-содержащих прокоагулянтных микрочастицах. Коллоидные частицы, которые не ассоциированы с фактором VIII при инъекции, начнут захватывать и концентрировать FVII, а также другие эндогенные факторы крови (например, FIX), на поверхности тромбоцитов и ассоциировать их с любыми образующимися TF-содержащими прокоагулянтными микрочастицами; также возможно, что частицы без прикрепленных факторов тоже будут связываться и сливаться с поверхностью тромбоцитов, образуя TF-  
35 содержащие прокоагулянтные микрочастицы и действуя как оппортунистические ловушки для  
40

захвата и концентрирования дополнительных факторов, включая активированные формы — FVIIa и FIXa, на реакционной поверхности тромбоцитов во время разворачивания коагуляционного каскада.

5 Обычно при повреждении эндотелия тканевой фактор преобразует FVII в FVIIa и  
объединяется с ним. Затем комплекс TF-FVIIa мигрирует к поверхности активированных  
тромбоцитов, связывается с ней и начинает превращение FX в FXa для расщепления  
10 протромбина с образованием тромбина; этот процесс оптимизируется, когда комплексы FXa  
с FVIIa (высвобожденные из активированных тромбоцитов) образуют протромбиназный  
комплекс, который также собирается на экспонированных мембранных поверхностях  
активированных тромбоцитов и полученных из них TF-содержащих прокоагулянтных  
15 микрочастиц. Изобретение помещает FVII в непосредственной близости от этой реакционной  
поверхности, которая, возможно, разделилась на множество TF-содержащих  
прокоагулянтных микрочастиц. Таким образом, превращение в FVIIa (который остается  
связанным с коллоидной частицей и, следовательно, с тромбоцитом и микрочастицами) и  
15 образование комплекса TF-FVIIa происходит на реакционной поверхности тромбоцитов и их  
микрочастиц с двумя важными прямыми эффектами:

- 1) Локализованное превращение FX в FXa, который объединяется с FV  
20 («протромбиназный комплекс»), также на этих поверхностях тромбоцитов и TF-  
содержащих прокоагулянтных микрочастиц для получения в высокой степени  
локализованного тромбинового взрыва, который будет инициировать выработку  
фибрина и катализировать фазу амплификации; и одновременно
- 2) Локализованное превращение FIX в FIXa, который затем может ассоциировать с FVIII,  
25 который был колокализован посредством коллоидной частицы, с образованием  
теназного комплекса на тех же мембранных поверхностях, что подпитывает и  
оптимизирует таким образом фазу амплификации, которая была катализирована  
тромбином из теперь усиленной фазы инициации (см. п. 1 выше). Альтернативно и  
30 дополнительно мембрана коллоидных частиц может образовывать замещающий  
теназный комплекс, привлекающий FX и превращающий его в FXa

30 Как только инициируется коагуляционный каскад и образуется фибрин, тромбоциты обычно  
коагулируют, чтобы заполнить фибриновую сетку. Способность коллоидной частицы  
связываться и сливаться с тромбоцитами выполняет здесь заключительную роль в усилении  
адгезии тромбоцитов друг к другу в сетке для стабилизации сгустка.

35 Изобретение может действовать несколькими способами для улучшения превращения FX  
в FXa в присутствии как ограниченного количества FVIII, так и ингибиторов фактора FVIII. Во-  
первых, путем защиты, усиления и максимизации потенциала ограниченного количества FVIII,  
чтобы иметь возможность образовывать теназный комплекс с FIXa для катализа превращения  
40 FX в FXa; во-вторых, путем имитации действия FVIIIa и связывания FIXa для обеспечения

замещающего теназного комплекса для катализа превращения FX в FXa; в-третьих, путем активации внешнего пути как посредством продукции TF-содержащих прокоагулянтных микрочастиц, так и путем концентрирования FVII/FVIIa для стимуляции превращения FX в FXa посредством внешнего теназного комплекса; и, наконец, посредством усиления через активированный внешний путь превращения FIX в FIXa для обеспечения образования внутреннего теназного комплекса. Благодаря этим действиям изобретение имеет множество способов действия путем защиты, сохранения и максимизации активности FVIII в теназном комплексе внутреннего пути, при этом имитируя функциональность FVIIIa в теназном комплексе, а также одновременно обходя этот путь посредством активации внешнего пути.

10

Коллоидная частица обладает двойным действием как в качестве агента обходного действия для усиления превращения FX в FXa по внешнему пути, так и в качестве агента для усиления внутреннего пути как посредством защиты FVIII, так и посредством концентрирования FIX/FIXa, ускоряющего образование теназного комплекса или образующего FVIII-независимый теназный комплекс с FIXa. Вместе усиленные фазы инициации (внешняя) и амплификации (внутренняя) обеспечивают как более быстрое начало свертывания, так и более быстрое образование фибрина, который может быть связан в более твердый сгусток, чем это обычно возможно при таком уменьшенном количестве фактора VIII — особенно в присутствии ингибиторных антител, — что приводит к более быстрому разрешению кровотечения у пациента.

20

Таким образом, изобретение опирается на способность коллоидной частицы, и, в частности, специфического соотношения коллоидной частицы и фактора VIII в составе, концентрировать правильные количества как эндогенного, так и экзогенного фактора VIII на поверхности тромбоцитов и внутри тромбоцитов, а также стимулировать выработку TF-содержащих прокоагулянтных микрочастиц, таким образом, что как фаза инициации, сконцентрированная вокруг TF-FVIIa, так и фаза амплификации коагуляционного каскада оптимизируются вместе с синергетическим эффектом ускорения начала образования тромбина при ограниченном количестве фактора VIII в присутствии ингибиторов фактора VIII (в случае гемофилии A).

30

Поскольку инъецированный экзогенный фактор VIII защищен от деградации как ингибиторами, так и нормальными механизмами элиминации, и поскольку сгусток лучшего качества образуется быстрее как за счет концентрирования факторов на тромбоците, так и за счет ускоряющего эффекта TF-содержащих прокоагулянтных микрочастиц, изобретение будет сберегать фактор VIII по сравнению с другими способами снабжения фактором VIII, что обнаружено при продуцировании эктопического FVIII в тромбоцитах с помощью генной терапии. Это преимущество будет проявляться в меньшем количестве инъекций или менее частых инъекциях для пациентов, повышении приверженности соблюдению предписанного лечения и снижении вероятности случайного и возможно смертельного кровотечения.

40

В то время как изобретение концентрирует экзогенный фактор VIII и эндогенные факторы (FVII/FVIIa и FIX/FIXa) на тромбоцитах и внутри тромбоцитов, в отличие от успешных попыток выработки FVIII эктопически в тромбоцитах с помощью генной терапии, оно не требует программ длительной разработки, не связано с регуляторным бременем или необратимым характером трансгенной терапии, опосредованной вирусами.

Предполагается, что путем концентрирования и усиления эффекта ограниченного количества фактора VIII, который при заболевании, подлежащем лечению (например, FVIII в случае гемофилии А (ГА)), находится на более низком, чем обычно, уровне, изобретение будет сберегать фактор VIII, позволяя вводить более низкие дозы и/или уменьшать количество инъекций, которые обычно требуются для достижения гемостаза у пациентов с гемофилией и, в частности, у пациентов с ингибиторной формой заболевания, которым обычно нельзя вводить фактор VIII, поскольку их ингибиторные антитела будут разрушать этот белок и оставлять их незащищенными.

В отличие от подходов к созданию новых сконструированных генно-инженерными методами молекул фактора VIII, или миметиков этих молекул, или их активированных форм, настоящее изобретение можно применять с любым доступным в настоящее время полученным из плазмы или рекомбинантным фактором VIII, без необходимости встраивания чужеродных последовательностей в молекулу, например, рекомбинантного человеческого FVIII (rhFVIII). Это снижает риск иммуномодулирующего ответа, возникающего на новый нераспознанный белок.

В отличие от обоих этих подходов, т. е. выработки FVIII в тромбоцитах или применения миметиков, настоящее изобретение обладает новым и очень необходимым двойным действием, заключающимся не только в концентрировании экзогенно внесенного компонента внешнего ускорительного пути, но также и в концентрировании эндогенных факторов и стимулировании выработки TF-содержащих прокоагулянтных микрочастиц для амплификации внутреннего пути для быстрого тромбинового взрыва и локального образования другого основного компонента (FIXa) внешнего пути, который может продолжать стимулировать общий путь к выработке тромбина, когда уровни фактора VIII снова падают.

Применение согласно настоящему изобретению обеспечивает сбережение фактора VIII по сравнению с применением свободного фактора VIII. Это означает большее удобство для пациентов (меньшие по объему инъекции), лучшую приверженность соблюдению режима терапии (меньшее количество пропущенных профилактических инъекций) и более экономичные расходы на здравоохранение (меньшая стоимость фактора VIII, меньшее количество экстренных инфузий, когда больные гемофилией не соблюдали режим терапии и у них развилось кровотечение).

40

Конечная цель изобретения заключается в том, чтобы сделать возможным экономичное решение для обеспечения профилактического лечения с помощью FVIII у пациентов с ингибиторной формой гемофилии А, что достигается посредством обеспечения возможности применять стандартные полученные из плазмы или получаемые рекомбинантно формы фактора VIII.

Применение изобретения является берегающим по сравнению с применением экзогенного FVIIa в качестве агента обходного действия у пациентов с гемофилией с ингибиторами. Изобретение не только применяет собственный FVII пациента, но и концентрирует его на тромбоцитах и стимулирует выработку TF-содержащих прокоагулянтных микрочастиц для максимизации эффективности FVII, что позволяет избежать затрат на экзогенный FVIIa и любых проблем тромботических реакций из-за передозировки этим белком.

Композицию можно вводить путем инъекции или инфузии, предпочтительно внутривенно, подкожно, внутрикожно или внутримышечно. Инъекция включает введение однократной дозы композиции. Инфузия включает введение композиции в течение продолжительного периода времени.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить по меньшей мере один раз в сутки, по меньшей мере два раза в сутки, приблизительно один раз в неделю, приблизительно два раза в неделю, приблизительно один раз в две недели или приблизительно один раз в месяц. Композицию также можно вводить и/или повторно вводить с интервалами, позволяющими поддерживать концентрацию FVIII в крови на постоянном уровне, обеспечивая устойчивый, постоянный и предсказуемый терапевтический эффект, без необходимости ожидания повторной дозы до тех пор, пока концентрация FVIII в крови пациента не достигнет субтерапевтических или терапевтически нерелевантных уровней. В традиционной практике последующие дозы FVIII обычно не вводят субъекту, пока «здоровые уровни» или терапевтически эффективные/соответствующие уровни FVIII все еще присутствуют в кровотоке. Таким образом, изобретение обеспечивает более стабильный терапевтический уровень FVIII в кровотоке, который более идеально подходит для профилактики.

Субтерапевтические или терапевтически нерелевантные уровни FVIII в крови субъекта могут быть охарактеризованы как уровни, при которых пациент не способен поддерживать время свертывания цельной крови на уровне 20 минут или менее, 15 минут или менее или 12 минут или менее.

Согласно изобретению предложена композиция, причем пациент способен поддерживать время свертывания цельной крови не более 20 минут, не более 15 минут или не более 12 минут.

Неожиданно было обнаружено, что составы факторов крови в сочетании с коллоидными частицами (липосомами), дериватизированными биосовместимым полимером, можно успешно вводить подкожно с обеспечением терапевтически эффективной дозы фактора крови у субъекта, страдающего гемофилией.

5

В примерах настоящего изобретения ПЭГ внедряют в коллоидную частицу во время образования везикул, до связывания с фактором крови. Считается, что специфические аминокислотные последовательности на факторе крови могут нековалентно связываться с карбаматными частями молекул ПЭГ на внешней стороне липосом.

10

Коллоидная частица не инкапсулирует фактор крови. Фактор крови нековалентно взаимодействует с полимерными цепями на внешней поверхности липосом, и никакой химической реакции для активации полимерных цепей не проводится. Характер взаимодействия между фактором крови и липосомой, дериватизированной биосовместимым гидрофильным полимером, может быть любым нековалентным механизмом, таким как ионные взаимодействия, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и ван-дер-ваальсовы взаимодействия (Arakawa, T. and Timasheff, S. N., *Biochemistry* 24: 6756- 6762 (1985); Lee, J. C. and Lee, L. L. Y., *J. Biol. Chem.* 226: 625-631 (1981)). Примером такого полимера является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

20

Для получения образующих везикулы липидов, дериватизированных гидрофильными полимерами, можно использовать множество известных реакций конденсации. Например, полимером (таким как ПЭГ) можно дериватизировать липид, такой как фосфатидилэтаноламин (ФЭ), через цианурхлоридную группу. В соответствии с другим вариантом, кэпированный ПЭГ может быть активирован реагентом, способствующим реакции конденсации, карбонилдиимидазолом с образованием активированного соединения имидазола. Карбамат-связанное соединение может быть получено посредством реакции концевой гидроксильной группы МПЭГ (метоксиПЭГ) с *p*-нитрофенилхлорформиадом с получением *p*-нитрофенилкарбоната. Этот продукт затем подвергают реакции с 1-амино-2,3-пропандиолом с получением промежуточного карбамата. Гидроксильные группы диола ацилируют с получением конечного продукта. Аналогичный синтез с применением глицерина вместо 1-амино-2,3-пропандиола можно применять для получения карбонат-связанного продукта, как описано в WO 01/05873. Другие реакции хорошо известны и описаны, например, в US 5,013,556.

35

Коллоидные частицы (липосомы) можно классифицировать по различным параметрам. Например, когда в качестве параметров применяют размер и количество ламелл (структурные параметры), можно описать три основных типа липосом: мультиламеллярные везикулы (МЛВ), малые моноламеллярные везикулы (ММВ) и большие моноламеллярные везикулы (БМВ).

40

МЛВ являются везикулами, которые образуются спонтанно при гидратации высушенных фосфолипидов при температуре выше температуры их фазового перехода гель — жидкий кристалл ( $T_m$ ). Размер МЛВ неоднороден, и они имеют структуру, состоящую из чередующихся  
5 концентрических водных и липидных слоев, напоминающую луковицу.

ММВ получают из МЛВ при помощи ультразвуковой обработки или другими способами, такими как экструзия, гомогенизация под высоким давлением или перемешивание с высоким усилием сдвига; ММВ являются однослойными. Они представляют собой самые маленькие везикулы  
10 с высоким отношением площади поверхности к объему, а следовательно, имеют самый низкий объем захвата водного пространства относительно массы липида.

Липосома третьего типа, БМВ, имеет большой водный компартмент и один липидный слой (моноламеллярная липосома) или несколько (олиголамеллярная липосома) липидных слоев.  
15 Дополнительная подробная информация раскрыта в публикации D. Lichtenberg and Y. Varenholz, in "Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation, in Methods of Biochemical Analysis", Vol. 33, pp. 337 – 462 (1988).

Используемый в данной заявке термин «загрузка» означает любое взаимодействие  
20 биополимерных субстанций, подвергаемых загрузке, например такое взаимодействие, как инкапсуляция, адгезия (к внутренней или внешней стенке везикулы) или встраивание в стенку, с экструзией биополимерных субстанций или без нее.

Используемый данной заявке термин «липосома» относится, как было указано выше, к  
25 коллоидным частицам и охватывает все сферы или везикулы любых амфипатических соединений, которые могут спонтанно или не спонтанно образовывать везикулы, например фосфолипидов, в которых по меньшей мере одна ацильная группа заменена на сложный эфир фосфорной кислоты. Липосомы могут присутствовать в любом физическом состоянии, начиная от стеклообразного состояния и заканчивая жидким кристаллом. Подходящими  
30 являются большинство триацилглицеридов, а наиболее распространенными фосфолипидами, подходящими для применения в настоящем изобретении, являются лецитины (также называемые фосфатидилхолинами (ФХ)), которые представляют собой смеси диглицеридов стеариновой, пальмитиновой и олеиновой кислот, соединенных с холиновым эфиром фосфорной кислоты. Лецитины встречаются у всех животных и растений,  
35 например, в яйцах, соевых бобах и тканях животных (головной мозг, сердце и пр.), и их можно также синтезировать. Источник фосфолипида или способ его синтеза не являются критическими, можно применять любой природный или синтетический фосфатид.

Примерами специфических фосфатидов являются L- $\alpha$ -(дистеароил)лецитин, L- $\alpha$ -  
40 (дипальмитоил)лецитин, L- $\alpha$ -фосфатидная кислота, L- $\alpha$ -(дилауроил)фосфатидная кислота, L-

а-(димиристоил)фосфатидная кислота, L-а-(диолеоил)фосфатидная кислота, DL-а-(ди-пальмитоил)фосфатидная кислота, L-а-(дистеароил)фосфатидная кислота и различные типы L-а-фосфатидилхолинов, полученных из головного мозга, печени, яичного желтка, сердца, соевых бобов и пр. или полученных синтетическим путем, и их соли. Другие подходящие  
5 модификации включают контролируемое перекисное окисление кросс-линкеров ацильных остатков жирных кислот в фосфатидилхолинах (ФХ) и цвиттерионных амфипатических молекулах, которые образуют мицеллы сами по себе или при смешивании с такими ФХ, как алкильные аналоги ФХ.

10 Фосфолипиды могут различаться по чистоте и также могут быть гидрированы полностью либо частично. Гидрирование снижает уровень нежелательного перекисного окисления, оно изменяет и регулирует температуру фазового перехода гель — жидкий кристалл ( $T_m$ ), которая влияет на упаковку и утечку.

15 Липосомы могут быть «адаптированы» к требованиям любого конкретного резервуара, включая различные биологические жидкости, сохраняют свою стабильность без агрегации или хроматографического разделения и остаются хорошо диспергированными и  
20 суспендированными в инъекционной жидкости. Текучесть *in situ* изменяется в зависимости от состава, температуры, солености, двухвалентных ионов и присутствия белков. Липосому можно применять с любым другим растворителем или поверхностно-активным веществом или без них.

Обычно подходящие липиды могут иметь композицию ацильных цепей, которая характерна, по меньшей мере в отношении температуры перехода ( $T_m$ ), для компонентов в виде ацильных  
25 цепей в ФХ из яиц или соевых бобов, т. е. одна цепь насыщенная и одна ненасыщенная или обе ненасыщенные. Однако нельзя исключать возможность применения двух насыщенных цепей.

Липосомы могут содержать другие липидные компоненты, если только они не приводят к  
30 нестабильности и/или агрегации и/или к хроматографическому разделению. Это можно определить с помощью стандартного эксперимента.

Пегилированный фосфолипид может быть физически присоединен к поверхности коллоидной  
35 частицы или встроен в мембрану коллоидной частицы. Следовательно, полимер может быть ковалентно связан с коллоидной частицей.

Известны и доступны различные способы получения модифицированных коллоидных частиц, которые являются моноламеллярными или мультламеллярными (см. Lichtenberg and  
40 Barenholz, (1988)):

1. Тонкую пленку фосфолипида гидратируют водной средой с последующим механическим встряхиванием, и/или ультразвуковой обработкой, и/или экструзией через подходящий фильтр.
2. Растворение фосфолипида в подходящем органическом растворителе, смешивание с водной средой и последующее удаление растворителя.
3. Применение газа выше его критической точки (т. е. фреонов и других газов, таких как CO<sub>2</sub>, или смесей CO<sub>2</sub> и других газообразных углеводородов) или
4. Приготовление мицелл из смеси липида с детергентом с последующим снижением концентрации детергента до уровня ниже его критической концентрации, при которой образуются липосомы.

Обычно такими способами получают коллоидные частицы неоднородного размера приблизительно от 0,02 до 10 мкм или больше. Поскольку для применения в настоящем изобретении предпочтительными являются коллоидные частицы относительно небольшого размера и достаточно однородные по размеру, для уменьшения размера и неоднородности распределения по размеру коллоидных частиц можно применять вторую стадию обработки, называемую «уменьшением размера коллоидных частиц».

Суспензию коллоидных частиц можно сортировать по размеру, чтобы добиться селективного распределения везикул по размерам в диапазоне менее чем приблизительно 5 мкм, например < 0,4 мкм. В одном из вариантов реализации изобретения коллоидные частицы имеют средний диаметр частиц от приблизительно 0,03 до 0,4 микрон (мкм) или от 0,05 до 0,15 микрон (мкм), предпочтительно приблизительно 0,1 микрон (мкм).

Коллоидные частицы в этом диапазоне можно легко стерилизовать фильтрованием через подходящий фильтр. Меньшие по размеру везикулы также демонстрируют меньшую склонность к агрегации при хранении, и тем самым снижаются потенциально серьезные проблемы с блокировкой или закупориванием при инъекционном введении липосомы внутривенно или подкожно. Наконец, липосомы, отобранные по размеру в субмикронном диапазоне, демонстрируют более равномерное распределение.

Для уменьшения размера и неоднородности размера коллоидных частиц доступно несколько способов, подходящих для настоящего изобретения. Ультразвуковая обработка суспензии коллоидных частиц в стандартной ультразвуковой ванне либо с помощью ультразвукового зонда приводит к постепенному уменьшению размеров вплоть до малых моноламеллярных везикул (МЛВ) размером от 0,02 до 0,08 мкм.

Гомогенизация представляет собой еще один способ, который основан на применении энергии сдвига для фрагментации больших коллоидных частиц на более мелкие. Во время типичной процедуры гомогенизации суспензию коллоидных частиц многократно пропускают

через стандартный эмульсионный гомогенизатор до тех пор, пока не будут наблюдаться выбранные размеры липосом, обычно от приблизительно 0,1 до 0,5 мкм. В обоих способах распределение частиц по размерам может контролироваться с помощью обычного лазерного анализатора гранулометрического состава частиц.

5

Также эффективным способом уменьшения размеров коллоидных частиц до относительно однородного распределения частиц по размерам является экструзия коллоидных частиц через мелкопористый поликарбонатный фильтр или эквивалентную мембрану, причем средний размер частиц находится в диапазоне от приблизительно 0,02 до 5 мкм, в зависимости от размера пор мембраны.

10

Как правило, суспензию повторно пропускают через одну мембрану или две расположенные друг над другом мембраны несколько раз, пока не будет достигнуто требуемое распределение коллоидных частиц по размерам. Коллоидную частицу можно экструдировать через мембраны с последовательно уменьшающимся размером пор, чтобы обеспечить постепенное уменьшение размера липосом.

15

Другими способами, которые доступны для получения липосомной суспензии с размерами частиц ниже выбранного порогового значения менее 1 мкм, являются центрифугирование и молекулярно-ситовая хроматография. Эти два способа преимущественно обеспечивают удаление больших липосом, а не превращение больших частиц в более мелкие частицы. Соответственно уменьшается выход коллоидных частиц.

20

Суспензию коллоидных частиц, доведенную до требуемого размера частиц, можно легко стерилизовать путем пропускания через стерилизующую мембрану, имеющую размер пор для дискриминации частиц по размеру приблизительно 0,4 мкм, такую как обычный глубинный мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Липосомы стабильны в лиофилизированной форме, и их можно восстанавливать незадолго до применения путем погружения в воду.

25

Подходящие липиды для формирования коллоидных частиц описаны выше. Подходящими примерами являются, без ограничений, фосфолипиды, такие как димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ) и/или димиристоилфосфатидилглицерин (ДМФГ), полученные из яиц и соевых бобов фосфолипиды, подвергнутые частичной или полной очистке, в том виде как они есть или подвергнутые частичному или полному гидрированию.

30

35

Следующие четыре способа описаны в WO 95/04524 и обычно подходят для получения коллоидных частиц (липосом), применяемых в соответствии с настоящим изобретением.

#### Способ А

- а) смешивают амфипатические субстанции, такие как липиды, подходящие для образования везикул, в не смешивающихся с водой органических растворителях;
- 5 б) удаляют растворитель в присутствии твердофазного носителя, или, в соответствии с другим вариантом, высушенные амфипатические субстанции или их смеси можно непосредственно применять в любой форме (порошок, гранулят и пр.);
- с) загружают продукт со стадии б) в раствор биополимерных субстанций в физиологически совместимом растворе;
- д) добавляют органический растворитель, обладающий солюбилизующими или диспергирующими свойствами, а также
- 10 е) высушивают фракцию, полученную на стадии д), в условиях, обеспечивающих сохранение функции биополимерных субстанций.

На стадии а) Способа А амфипатические субстанции, подходящие для образования везикул, как было указано выше, смешивают с не смешивающимся с водой органическим

15 растворителем. Не смешивающийся с водой органический растворитель может представлять собой полярный протонный растворитель, такой как фторированные углеводороды, хлорированные углеводороды и т. п.

На стадии б) способа согласно настоящему изобретению растворитель удаляют в присутствии

20 твердофазного носителя. Твердофазный носитель может представлять собой инертный органический или неорганический материал, имеющий форму шариков. Материалом неорганического носителя может быть стекло, а материалом органического носителя может быть Тефлон™ или другие аналогичные полимеры.

На стадии с) Способа А согласно настоящему изобретению загружают продукт, полученный

25 на стадии б), в раствор субстанций, которые нужно инкапсулировать, в физиологически совместимом растворе.

Физиологически совместимый раствор может быть эквивалентен раствору хлорида натрия с

30 массовой концентрацией до приблизительно 1,5%. Можно применять и другие соли, если они физиологически совместимы, например, в качестве криопротектора, например, сахара и/или аминокислоты. Например, в качестве криопротекторов можно применять лактозу, сахарозу или трегалозу.

Необязательно между стадиями а) и б) может быть предусмотрена стадия инактивации

35 вирусов, стерилизации, депирогенирования, фильтрации фракции или т. п., полученной на стадии а). Это может быть полезно для того, чтобы иметь фармацевтически приемлемый раствор на ранней стадии получения.

На стадии d) Способа А добавляют органический растворитель, обладающий солюбилизующими или диспергирующими свойствами.

5 Органический растворитель может представлять собой органический полярный протонный растворитель, смешивающийся с водой. Можно также применять низшие алифатические спирты, содержащие от 1 до 5 атомов углерода в алкильной цепи, такие как третичный бутанол (трет-бутанол). Количество органического полярного протонного растворителя, смешивающегося с водой, сильно зависит от его мешающего воздействия на субстанцию, которую необходимо загрузить в липосомы. Например, если необходимо загрузить белок, то  
10 верхний предел устанавливается как количество растворителя, при котором он начинает влиять на активность белка. Этот показатель может сильно варьировать в зависимости от природы субстанции, которую необходимо загрузить. Например, если фактор свертывания крови содержит фактор IX, то количество трет-бутанола составляет приблизительно 30%, тогда как для фактора VIII подходит количество менее 10% трет-бутанола (фактор VIII гораздо  
15 более чувствителен к воздействию трет-бутанола). Процентное содержание трет-бутанола в этих примерах основано на объемном проценте, рассчитанном для конечной концентрации.

Необязательно после стадии d) можно проводить инактивацию вирусов, стерилизацию и/или  
20 разделение на аликвоты фракции, полученной на стадии d).

На стадии e) настоящего изобретения проводят сушку фракции, полученной на стадии d), в условиях, сохраняющих функцию субстанции, которую необходимо загрузить. Одним из способов сушки смеси является лиофилизация. Лيوфилизацию можно проводить в присутствии криопротектора, например лактозы или других сахаридов или аминокислот. В  
25 соответствии с другим вариантом можно применять выпаривание или распылительную сушку.

Высушенный остаток можно восстановить в водной среде перед применением. После восстановления твердого вещества оно образует дисперсию соответствующих липосом. Водная среда может содержать солевой раствор, а образовавшуюся дисперсию  
30 необязательно можно пропустить через подходящий фильтр, чтобы при необходимости уменьшить размер липосом. Преимущественно липосомы могут иметь размер от 0,02 до 5 мкм, например, в диапазоне < 0,4 мкм.

Липосомы, получаемые Способом А, демонстрируют высокую загрузку факторов крови.  
35

Композиции согласно настоящему изобретению могут также представлять собой промежуточный продукт, получаемый путем выделения любой из фракций стадии c) или d) Способа А. Соответственно, состав согласно настоящему изобретению также включает водную дисперсию, которую можно получить после восстановления продукта стадии e)  
40 Способа А в воде с образованием дисперсии (липосом в водной среде).

В соответствии с другим вариантом фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также можно получать следующими способами, названными Способами В, С, D и Е.

5

Способ В

Этот способ также включает стадии а), b) и с) Способа А. Однако стадии d) и е) Способа А опущены.

10 Способ С

В Способе С стадия d) Способа А заменена на цикл замораживания и оттаивания, который необходимо повторить по меньшей мере два раза. Эта стадия хорошо известна в этой области техники и применяется для получения липосом.

15 Способ D

Способ D исключает применение любого осмотического компонента. Способ D включает стадии получения везикул, смешивания и получения по существу свободного от солей раствора субстанций, которые необходимо загрузить, и совместной сушки полученных таким образом фракций.

20

Способ Е

Способ Е проще, чем описанные выше способы А–D. Он требует растворения соединений, применяемых для получения липосом (липиды, антиоксиданты и т. д.), в полярном протонном смешивающемся с водой растворителе, таком как трет-бутанол. Этот раствор затем смешивают с водным раствором или дисперсией, содержащей фактор крови. Смешение осуществляют при оптимальном соотношении объемов, необходимом для поддержания биологической и фармакологической активности агента.

25

Затем смесь лиофилизируют в присутствии или в отсутствие криопротектора. Перед применением требуется провести регидратацию липосомного состава. Эти липосомы являются мультиламеллярными, уменьшение их размеров можно обеспечить одним из способов, описанных в WO 95/04524.

30

Композицию для применения в лечении гемофилии А у субъекта согласно первому аспекту настоящего изобретения можно применять для субъекта, который получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII). Например, субъект, возможно, никогда не получал терапию фактором VIII (FVIII); такого пациента называют ранее не получавшим лечение пациентом (РНЛП). Например, субъект мог получать терапию фактором VIII (FVIII) через день в течение в общей сложности 98 дней, поэтому получил 49 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

35

40

5 Ранее не получавший лечение пациент (РНЛП) определяется как субъект, который никогда не получал терапию фактором VIII (FVIII). РНЛП подвергаются самому высокому риску выработки нейтрализующего антитела к экзогенному FVIII. Такой ранее не получавший лечение пациент также известен как «не получавший лечение пациент» или «пациент, который ранее не получал терапию фактором VIII (FVIII)».

10 Пациент, получавший минимальное лечение (ППМЛ), определяется как субъект, который получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII). ППМЛ также подвержены риску выработки нейтрализующего антитела к экзогенному FVIII.

15 Ранее получавшие лечение пациенты (РПЛП) определяются как субъект, получивший 50 дней воздействия или более в рамках терапии фактором VIII (FVIII). У РПЛП меньше вероятность выработки нейтрализующего антитела к экзогенному FVIII.

Композицию для применения в лечении гемофилии А у субъекта согласно первому аспекту настоящего изобретения можно применять у субъекта детского возраста. В Европейском союзе (ЕС) пациент детского возраста определяется как часть популяции в возрасте от рождения до 18 лет. Педиатрическая популяция включает несколько подмножеств.

20 Применяемая возрастная классификация пациентов детского возраста:

- недоношенные и доношенные новорожденные — от 0 до 27 дней;
- младенцы (или малыши) — от 1 месяца до 23 месяцев;
- дети — от 2 до 11 лет; и
- подростки — от 12 до менее 18 лет.

25 (см.: [http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/2014\\_c338\\_01/2014\\_c338\\_01\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/2014_c338_01/2014_c338_01_en.pdf))

30 Гемофилия А может представлять собой врожденную гемофилию А (ВГА) или приобретенную гемофилию А (ПГА). Врожденная гемофилия является наследственным нарушением свертывания крови, характеризующимся отсутствием или снижением уровня фактора свертывания крови VIII. Приобретенная гемофилия представляет собой аутоиммунное состояние, при котором происходит внезапная выработка ингибиторных аутоантител у индивидуума без каких-либо случаев кровотечения в личном или семейном анамнезе. При гемофилии А организм вырабатывает аутоантитела к фактору VIII.

35 РНЛП или ППМЛ также может иметь менее 5 единиц Бетезда активности ингибитора FVIII (антитела), т. е. у пациента может быть положительный результат теста на наличие ингибиторов (антител) к FVIII. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением у пациента может быть проведено тестирование на наличие ингибиторов FVIII (антител к FVIII).

40 Ингибиторные антитела в крови пациента количественно определяют с помощью метода

Бетезда, и обычно используют «единицы Бетезда», когда говорят об уровне ингибиторов (антител) у пациента. Значение более 5 единиц Бетезда ингибитора FVIII считается высоким титром ингибитора (см. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-recombinant-human-plasma-derived-factor-viii-products-revision-2\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-recombinant-human-plasma-derived-factor-viii-products-revision-2_en.pdf)).

5

Композицию для применения в лечении гемофилии А у субъекта согласно первому аспекту изобретения можно также применять в лечении субъекта, который имеет менее 5 единиц Бетезда активности ингибитора FVIII (антитела).

- 10 Единица Бетезда (БЕ) является мерой активности ингибитора свертывания крови. Согласно «Практическому гемостазу», «1 единица Бетезда (БЕ) определяется как количество ингибитора в образце плазмы, которое нейтрализует 50% 1 единицы фактора VIII:C в нормальной плазме после 2 ч инкубации при 37 °С.» (Schumacher, Harold Robert (2000). Handbook of Hematologic Pathology. Informa Health Care, p. 583). Одна (1) единица фактора VIII
- 15 равна 1 МЕ/мл фактора VIII.

- Анализ Бетезда основан на измерении остаточной активности FVIII после разбавлений испытуемой плазмы. Для анализа требуется сравнение испытуемой смеси испытуемой плазмы и нормальной плазмы с контрольной смесью нормальной плазмы и буфера,
- 20 инкубированных в течение 2 часов при 37 °С. Процент остаточной активности в испытуемой смеси преобразуют в единицы Бетезда (БЕ).

Анализ Бетезда выполняют следующим образом:

- 25 1. Двукратные разведения испытуемой (полученной от пациента) плазмы [обычно 1/2–1/1024] осуществляют в имадазол-солевом буферном растворе и инкубируют с равным объемом пула нормальной плазмы при 37 °С. В модификации Неймегена разведения плазмы пациента осуществляют в плазме с дефицитом фактора VIII.
- 30 2. Готовят контрольную смесь, состоящую из равного объема нормальной плазмы, смешанной с имадазол-солевым буферным раствором (или в случае модификации Неймегена — с иммуноистощенной плазмой с дефицитом фактора VIII). Пул нормальной плазмы будет содержать приблизительно 100% [100 МЕ/дл] фактора VIII. Эта смесь фактически имеет начальную концентрацию 50% [50 МЕ/дл] фактора VIII
- 35 (потому что вы выполнили разведение 50 : 50 буфером), но это не имеет значения, потому что ко всем инкубационным смесям добавляется один и тот же источник и объем. Применение контроля позволяет учитывать ухудшение активности факторов VIII и V в течение инкубационного периода.

3. В конце инкубационного периода остаточный фактор VIII анализируют с применением стандартного 1-стадийного анализа на основе АЧТВ с инкубированным контролем в качестве 100% стандарта [100 МЕ/дл].
- 5 4. Концентрацию ингибитора рассчитывают по графику зависимости остаточной активности фактора VIII от количества единиц ингибитора. Для расчета уровня ингибитора выбирают разведение испытуемой плазмы, которое дает значение остаточной активности фактора VIII, ближайшее к 50%, но в диапазоне 30–60%. Можно также рассчитать титр ингибитора для каждого разведения и взять среднее значение.
- 10 Любая остаточная активность фактора VIII <25% [25 МЕ/дл] или >75% [75 МЕ/дл] НЕ должна использоваться для расчета уровня ингибитора.
5. Если остаточная активность фактора VIII составляет 80–100% [80–100 МЕ/дл], образец не содержит ингибитора.
- 15 6. Определяют титр ингибитора по графику и умножают на кратность разведения, чтобы получить окончательный титр. Следует включить положительный контроль в виде плазмы с известным титром ингибитора.
- 20 Уровни активности в коагуляционном каскаде можно измерять с помощью любого подходящего анализа, например, проводя тест на время свертывания цельной крови (ВСЦК), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) или РОТЭМ. В одностадийном и двухстадийном/хромогенном анализах образцы крови должны быть подготовлены с помощью центрифугирования для удаления фрагментов клеток, главным образом потому, что
- 25 этот метод анализа включает спектрофотометрию, поэтому образец должен быть прозрачным. Приведенные ниже общие анализы свертывания крови позволяют оценить динамику физического образования сгустка и, таким образом, находятся ближе к «реальной жизни», поскольку включены все компоненты, которые способствуют образованию сгустка, например, тромбоциты.
- 30 В тесте на время свертывания цельной крови (ВСЦК) измеряют время, затрачиваемое цельной кровью на образование сгустка во внешней среде, обычно в стеклянной пробирке или чашке. ВСЦК можно оценить с помощью 2 мл цельной крови, отобранной сразу после взятия крови и разделенной на две стеклянные пробирки. Затем эти две пробирки помещают в
- 35 водяную баню с температурой 37 °С и проверяют приблизительно каждые 20–30 секунд, осторожно наклоняя. Образование сгустка определяют, когда пробирку можно перевернуть в горизонтальное положение, и при этом не вытекает плазма и твердый сгусток удерживается в пробирке.

Тест на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) позволяет измерить параметр части пути свертывания крови. Он аномально повышен при гемофилии и внутривенной терапии гепарином. Для определения АЧТВ нужно несколько миллилитров крови из вены. Время АЧТВ является мерой одной части системы свертывания крови, известной как «внутренний путь». Значение АЧТВ представляет собой время в секундах, затрачиваемое на протекание специфического процесса свертывания крови в условиях лабораторного теста. Этот результат всегда сравнивают с «контрольным» образцом нормальной крови. Если испытуемому образцу требуется больше времени, чем контрольному образцу, это свидетельствует об ослаблении функции свертывания крови во внутреннем пути.

5

10

Общая медикаментозная терапия обычно ориентирована на диапазон АЧТВ порядка 45–70 секунд, но это значение можно также выразить как соотношение тестового значения и нормального значения, например, в 1,5 раза больше нормального. Высокое АЧТВ при отсутствии лечения гепарином может быть вызвано гемофилией, что может потребовать дальнейшего тестирования.

15

РОТЭМ (ротационная тромбоэластометрия) проводится с использованием системы ROTEM Delta 2.7.2 для оценки свертываемости образцов крови с помощью анализа NATEM (с активацией только повторной кальцификацией). Для измерения в прибор помещают 20 мкл  $\text{CaCl}_2$  и 340 мкл образца цитратной цельной крови. Анализ проводят в течение 15 минут после

20

взятия свежего образца крови. Анализ предоставляет множество статистических данных во время образования сгустка, включая, среди прочего, время свертывания (СТ, время начала свертывания крови), время образования сгустка (CFT, время до максимальной твердости сгустка).

25

Согласно изобретению предложена композиция, которая позволяет субъекту поддерживать время свертывания цельной крови менее 20 минут, менее 15 минут или, предпочтительно, менее 12 минут.

Ниже описан хромогенный анализ (иногда называемый «двухстадийным анализом») для

30

оценки концентрации FVIII.

Активность FVIII в плазме может быть определена с помощью хромогенного анализа Chromogenix Coamatic Factor VIII (Diapharma, K822585) с модификациями предложенного

35

способа следующим образом:

- i. Включение некоторого количества плазмы от не подвергавшегося лечению субъекта в стандартные препараты FVIII для достижения сопоставимости с разведениями образцов плазмы.
  - ii. Применение стандартов FVIII, специфичных для каждого исследуемого
- 40
- объекта (Nuwiq™ или Factane™).

iii. Включение дополнительных значений активности FVIII в пределах двух диапазонов стандартной кривой.

Приготовление исходных стандартных растворов FVIII — Nuwiq™ и Factice™:

- 5 Флакон каждого исследуемого объекта можно восстановить до 100 МЕ/мл очищенной водой, хранить в замороженном виде в небольших аликвотах при -70 °С и размораживать аликвоту при 37 °С в день проведения анализа. Для анализа соответствующих образцов плазмы используют исходный раствор, соответствующий исследуемому объекту.

Краткое описание метода анализа следующее:

- 10 1. Флакон плазмы, дефицитной по фактору VIII (Technoclone Factor VIII-deficient plasma, нативная; Diapharma 5154007), восстанавливали в 1 мл очищенной воды непосредственно перед анализом.
2. Свежеприготовленный стандартный рабочий исходный раствор FVIII (1 МЕ/мл) готовили путем добавления 0,010 мл соответствующего стандартного исходного раствора FVIII (100 МЕ/мл) к 0,990 мл плазмы, дефицитной по FVIII.
- 15 3. Реагент Coamatic Kit Factor, субстрат S-2765 + I-2581 и рабочий буферный раствор приготовили в соответствии с инструкциями к набору и предварительно нагрели до 37 °С.
4. Приготовили 20% стоп-раствор уксусной кислоты.
- 20 5. Получали стандартную кривую для рабочего исходного раствора FVIII (1 МЕ/мл) с использованием диапазона FVIII, соответствующего исследуемым образцам (см. Таблицы 1 и 2).
6. По одной аликвоте каждого испытуемого образца плазмы быстро размораживали при 37 °С.
- 25 7. 25 мкл размороженных испытуемых образцов плазмы разбавляли с помощью 2000 мкл рабочего буферного раствора.
8. 50 мкл разбавленных стандартов FVIII и разбавленных испытуемых образцов плазмы добавляли в лунки 96-луночного планшета в соответствии со схемой планшета и инкубировали в течение 4 минут при 37 °С.
- 30 9. 50 мкл факторного реагента добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 минут при 37 °С (стандартная кривая высокого диапазона) или 4 минут при 37 °С (стандартная кривая низкого диапазона).

10. В каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата S-2765 + I-2581 и инкубировали в течение 2 минут при 37 °С (стандартная кривая высокого диапазона) или 10 минут при 37 °С (стандартная кривая низкого диапазона).
- 5 11. В каждую лунку добавляли 50 мкл 20% стоп-раствора уксусной кислоты. Окраска раствора в лунках приобрела желтый оттенок, и измеряли оптическую плотность с помощью считывателя микропланшетов при длине волны поглощения 405 нм.
- 10 12. Активность стандарта FVIII (МЕ/мл) наносили на график в зависимости от оптической плотности при 405 нм с использованием наилучшим образом подобранной линейной кривой.
13. Поглощение испытуемого образца плазмы соотносили со стандартной кривой и регистрировали активность FVIII в МЕ/мл.
- 15 14. Рассчитывали средний (и медианный, если указано в отдельных исследованиях) результат для активности FVIII по 3 испытуемым образцам плазмы мышей в каждой временной точке и проводили фармакокинетический анализ полученных данных.

Дополнительные тесты для оценки концентрации FVIII включают:

20 Хромогенный анализ активности FVIII

Набор реагентов Biophen FVIII:C Assay Kit, кат. № 221406, использовали с образцами плазмы, разведенными в буфере для анализа в соотношении 1 : 10, и сравнивали с референсной стандартной кривой как для Nuwiq™, так и для человеческой плазмы. Каждая кривая была  
25 получена путем серийного разведения FVIII в плазме крови собак, дефицитной по FVIII, а затем разведения 1 : 10 в буфере для анализа. Стандартный диапазон для обеих кривых составлял 0,003–0,4 ед./мл, линейный диапазон составлял 0,13–1,00 ед./мл. Анализ проводили в соответствии с протоколом для набора.

30 Одностадийный анализ фактора VIII: система Siemens BCS-XP

Образцы измеряли относительно референсной кривой для FVIII собак, полученной с использованием нормальной объединенной плазмы собак, разведенной в вероналовом буфере Оурена, содержащем 2,5% плазмы собак, дефицитной по FVIII. Диапазон кривой  
35 составляет 5–200%. Образцы плазмы разбавляли 1 : 10 в вероналовом буфере Оурена, смешивали с плазмой, дефицитной по FVIII, затем добавляли Actin FS. После инкубации в течение 3 мин инициировали активацию с помощью CaCl<sub>2</sub> и измеряли время свертывания при 405 нм.

В соответствии со вторым аспектом, описанным выше, способ лечения гемофилии А у субъекта включает стадию введения композиции, содержащей коллоидную частицу. Указанная коллоидная частица содержит (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ). Второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

Биосовместимый гидрофильный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиалкиловых эфиров, полимолочных кислот и полигликолевых кислот, предпочтительно биосовместимый гидрофильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Дальтон, предпочтительно приблизительно 2000 Дальтон или 5000 Дальтон.

Фосфатидилхолин (ФХ) может представлять собой 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ).

Второй амфипатический липид может представлять собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ), такой как N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ2000) или N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ5000).

Коллоидная частица может дополнительно содержать (iii) неионное поверхностно-активное вещество.

Композиция может дополнительно содержать молекулу фактора VIII (FVIII). В альтернативном варианте способ может включать дополнительную стадию отдельного или последовательного введения композиции, содержащей молекулу фактора VIII (FVIII).

Композицию, содержащую коллоидную частицу, и композицию, содержащую фактор VIII, можно вводить как часть режима терапии. Предпочтительно можно ввести пациенту композицию, содержащую фактор VIII, и через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 15–120, 15–60, 15–30 минут ввести пациенту композицию, содержащую коллоидную частицу. Композицию, содержащую коллоидную частицу, и композицию, содержащую фактор VIII, можно вводить и/или повторно вводить с интервалами, позволяющими поддерживать концентрацию FVIII в

5 крови на постоянном уровне, обеспечивая устойчивый, постоянный и предсказуемый терапевтический эффект, без необходимости ожидания повторной дозы до тех пор, пока концентрация FVIII в крови пациента не достигнет субтерапевтических или терапевтически нерелевантных уровней, предпочтительно каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 день, например, от 2 до 21 дня, от 4 до 14 дней, от 4 до 7 дней. Например, композицию, содержащую фактор VIII, можно вводить пациенту за 15 минут до введения пациенту композиции, содержащей коллоидную частицу, причем две стадии введения повторяют каждые 4–5 дней.

10 В соответствии с другим вариантом, композицию, содержащую коллоидную частицу и фактор VIII, можно вводить и/или повторно вводить с интервалами, позволяющими поддерживать концентрацию FVIII в крови на постоянном уровне, обеспечивая устойчивый, постоянный и предсказуемый терапевтический эффект, без необходимости ожидания повторной дозы до тех пор, пока концентрация FVIII в крови пациента не достигнет субтерапевтических или терапевтически нерелевантных уровней, предпочтительно каждые 2,  
15 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 день, например, от 2 до 21 дня, от 4 до 14 дней, от 4 до 7 дней.

Такая схема лечения уменьшает количество FVIII, необходимое для лечения пациента, страдающего гемофилией А.

20 Гемофилия А может представлять собой врожденную гемофилию А (ВГА) или приобретенную гемофилию А (ПГА).

Субъект может представлять собой пациента детского возраста. Субъект также мог не получать терапию FVIII.

25 Изобретение также включает применение композиции, содержащей коллоидную частицу, в получении лекарственного средства для лечения гемофилии А у субъекта, который получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

30 В соответствии с третьим аспектом, описанным выше, набор содержит (i) композицию, содержащую коллоидную частицу, и (ii) композицию, содержащую молекулу фактора VIII (FVIII), для применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII). Указанная коллоидная частица состоит из (i) первого амфипатического липида, содержащего фосфатидилхолиновый (ФХ)  
35 фрагмент, и (ii) второго амфипатического липида, содержащего фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ). Второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером.

Лиофилизированные составы согласно настоящему изобретению можно поставлять в виде отдельных лекарственных форм вместе с подходящим разбавителем, адъювантом или вспомогательным веществом, например, физиологически приемлемым буфером. Коллоидная частица и/или фактор VIII (FVIII) в наборе могут быть предложены в виде лиофилизированного  
5 состава. В соответствии с другим вариантом фактор VIII (FVIII) в наборе может быть предложен в виде лиофилизированного состава, а коллоидная частица может быть предложена в виде раствора для восстановления фактора VIII (FVIII). Как описано в настоящей заявке, такие композиции могут дополнительно содержать фактор VIII в виде отдельной лекарственной формы или в составе коллоидных частиц, описанных в настоящей  
10 заявке. Лиофилизированная форма FVIII может быть предложена во флаконе с 500 МЕ. Коллоидная частица и/или фактор VIII (FVIII) в наборе могут быть предложены в водной форме, готовой к применению.

Коллоидная частица может дополнительно содержать неионное поверхностно-активное  
15 вещество.

Набор необязательно также включает инструкции по применению.

В соответствии с четвертым аспектом, описанным выше, набор содержит (i) композицию,  
20 содержащую коллоидную частицу, и (ii) композицию, содержащую молекулу фактора VIII (FVIII), для раздельного, одновременного или последовательного применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII). Указанная коллоидная частица состоит из (i) первого амфипатического липида, содержащего фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второго амфипатического липида, содержащего фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы,  
25 состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ). Второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером.

Лиофилизированные составы согласно настоящему изобретению можно поставлять в виде отдельных лекарственных форм вместе с подходящим разбавителем, адъювантом или вспомогательным веществом, например, физиологически приемлемым буфером. Коллоидная частица и/или фактор VIII (FVIII) в наборе могут быть предложены в виде лиофилизированного  
30 состава. В соответствии с другим вариантом фактор VIII (FVIII) в наборе может быть предложен в виде лиофилизированного состава, а коллоидная частица может быть предложена в виде раствора для восстановления фактора VIII (FVIII). Как описано в настоящей заявке, такие композиции могут дополнительно содержать фактор VIII в виде отдельной лекарственной формы или в составе коллоидных частиц, описанных в настоящей  
35 заявке. Лиофилизированная форма FVIII может быть предложена во флаконе с 500 МЕ.

Коллоидная частица и/или фактор VIII (FVIII) в наборе могут быть предложены в водной форме, готовой к применению.

5 Коллоидная частица может дополнительно содержать неионное поверхностно-активное вещество.

Набор необязательно также включает инструкции по применению.

10 В соответствии с пятым аспектом, описанным выше, лекарственная форма фармацевтической композиции содержит коллоидную частицу, содержащую (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ), причем указанный второй амфипатический липид содержит  
15 фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером, для применения в лечении гемофилии А у субъекта. Указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).

20 Коллоидная частица может дополнительно содержать неионное поверхностно-активное вещество.

Лекарственная форма может быть предложена в виде подходящих контейнеров или флаконов, содержащих соответствующую дозу для пациента, например, в виде флакона с 250 МЕ, 500 МЕ, 750 МЕ или 1000 МЕ. Лекарственная форма также может быть предложена  
25 в виде таблетки или в жидкой форме. Лекарственная форма также может находиться в лиофилизированной форме.

Неожиданный технический результат, демонстрируемый изобретением, достигается путем маскирования эпитопов FVIII, которые в обычной ситуации провоцировали бы иммунный ответ  
30 и последующую выработку антител к FVIII.

Не следуя какой-то определенной теории, авторы изобретения полагают, что эти преимущества обусловлены нековалентной ассоциацией PEG<sub>n</sub>Lip с доменом A3 в FVIII, что экранирует эпитопы в доменах легкой цепи FVIII от распознавания иммунной системой  
35 организма; и/или предотвращает эндоцитоз FVIII дендритными клетками. Внесение дополнительного ПЭГ обеспечивает дополнительные сайты связывания, потенциально концентрируя FVIII на липосомах.

Дополнительный ПЭГ обеспечивает бóльшую гидратационную оболочку, которая  
40 обеспечивает большее экранирование ассоциированного FVIII от нормальных механизмов

элиминации, обеспечивая длительный период гемостатического контроля за счет увеличения периода полувыведения FVIII из кровотока. Большое экранирование может также обеспечить лучшее экранирование эпитопов на FVIII от ингибиторных антител, облегчая применение продукта у пациентов с ингибиторами (антителами) к FVIII.

5

Связывание липосомы с областью домена A3 в FVIII оставляет домены C1 и C2 в FVIII свободными для связывания ФВ, который обеспечивает дополнительную защиту.

10 Считается, что комплекс пегилированных липосом, несущих FVIII, будет сливаться с тромбоцитами или поглощаться ими и может играть роль в активации последних, создавая содержащие тканевый фактор прокоагулянтные микрочастицы, которые могут активировать внешний путь и ускорять образование сгустка. Внесение дополнительных содержащих ПЭГ липида или поверхностно-активных веществ в липосому может дестабилизировать мембрану тромбоцитов и дополнительно ускорить эту активацию.

15

Этот эффект более выражен в рекомбинантных молекулах FVIII, которые обычно не вводят с ФВ, который бы естественным образом защищал эти эпитопы в FVIII дикого типа.

20 В дополнение к защите эпитопов, ассоциация с PEGlip может также продлевать период полувыведения FVIII, защищая FVIII от нормальных механизмов протеолитической элиминации, увеличивая интервал между дозами и уменьшая общее воздействие FVIII на пациента в динамике.

Неожиданное наблюдение описывается следующим образом:

25

30 Было разработано клиническое исследование для изучения применения PEGlip + FVIII у пациентов с ингибиторной формой заболевания, в котором предполагалось, что комбинация предотвратит атаку существующих антител на FVIII. Помимо пациентов с уже существующими антителами были включены некоторые пациенты, которые имели в анамнезе выработку антител в присутствии FVIII, но в настоящее время не демонстрировали наличие антител.

35 Примечательно, что было обнаружено, что у этих пациентов не вырабатывались новые антитела в присутствии комбинации PEGlip + FVIII с соотношением коллоидных частиц и молекул FVIII от 15 : 1 до 16 : 1, что означает, что PEGlip был способен экранировать эпитопы от дендритных/В-клеток и/или предотвращать эндоцитоз FVIII.

40 Также в качестве контроля был проведен эксперимент на собаках с гемофилией А по внутривенному введению PEGlip с человеческим FVIII с соотношением коллоидных частиц и молекул FVIII от 15 : 1 до 16 : 1. Такие эксперименты обычно затруднены, поскольку иммунная система животного естественным образом реагирует на чужеродный (человеческий) белок,

вырабатывая антитела. Примечательно, что в этом случае у животного не вырабатывались антитела к человеческому белку, когда его вводили в присутствии PEGlip.

Соответственно, применение PEGlip в комбинации с FVIII предотвращает выработку антител:

- 5
- у субъектов с выработкой антител в анамнезе, у которых должны были вырабатываться антитела к применяемому rFVIII;
  - у субъектов, не являющихся людьми, при введении чужеродного белка (rFVIII) в комбинации с PEGlip.

10 Следовательно, если PEGlip + FVIII не может спровоцировать гуморальный иммунный ответ у пациентов/субъектов со склонностью к проявлению такого ответа в анамнезе, применение PEGlip + FVIII у ранее не получавших лечение субъектов (почти исключительно у детей), у которых никогда не вырабатывались антитела к FVIII, должно снижать частоту появления пациентов с ингибиторной формой заболевания.

15

Получают и испытывают согласно изобретению следующие образцы:

1. Серия коллоидных частиц (PEGlip), включающая более высокие соотношения ДСФЭ-ПЭГ и ПОФХ, где ПЭГ представляет собой ПЭГ-2000.
- 20 2. Серия коллоидных частиц (PEGlip), включающая соотношения ДСФЭ-ПЭГ и ПОФХ, где ПЭГ представляет собой ПЭГ-5000.
3. Коллоидные частицы по п. 1 и п. 2, дополнительно содержащие полисорбат 80.
4. Серия коллоидных частиц (F-PEGlip), включающая более высокие соотношения ДСФЭ-ПЭГ и ПОФХ и/или высокомолекулярный ПЭГ.

25

В некоторых вариантах реализации предложены следующие составы:

Состав от 15 до 16 : 1

Частицы PEGlip, состоящие из 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоля-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ(2000)) в молярном соотношении 97 : 3 в 50 мМ натрий-цитратном буфере, в 9% суспензии, составленной с FVIII (Nuwiq™, Octapharma AG) при соотношении частицы PEGlip и молекулы FVIII от 15 до 16 : 1.

35 Состав от 7 до 8 : 1

Частицы PEGlip, состоящие из 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоля-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ(2000)) в молярном соотношении 97 : 3 в 50 мМ натрий-цитратном буфере, составленные в 9% суспензии с FVIII (Nuwiq™, Octapharma AG) при соотношении частицы PEGlip и молекулы FVIII от 7 до 8 : 1.

40

В альтернативных вариантах реализации предложены следующие составы:

Состав от 15 до 16 : 1

Частицы PEGLip, состоящие из 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ), N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоля-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-

- 5 фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ(2000)) в молярном соотношении 97 : 3 и полисорбата 80 в соотношении 9 : 1 (мас./мас.) (ПОФХ + ДСФЭ-ПЭГ(2000) : полисорбат 80) в 50 мМ натрий-цитратном буфере, в 9% суспензии, составленной с FVIII (Nuwiq™, Octapharma AG) при соотношении частицы PEGLip и молекулы FVIII от 15 до 16 : 1.

10 Состав от 7 до 8 : 1

Частицы PEGLip, состоящие из 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ), N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоля-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-

- 15 фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ(2000)) в молярном соотношении 97 : 3 и полисорбата 80 в соотношении 9 : 1 (мас./мас.) (ПОФХ + ДСФЭ-ПЭГ(2000) : полисорбат 80) в 50 мМ натрий-цитратном буфере, составленные в 9% суспензии с FVIII (Nuwiq™, Octapharma AG) при соотношении частицы PEGLip и молекулы FVIII от 7 до 8 : 1.

В одном конкретном варианте реализации изобретения предложена композиция для применения в лечении гемофилии А у субъекта, который получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII), которая имеет следующий состав:

- коллоидные частицы, состоящие из первого амфипатического липида, содержащего фосфатидилхолиновый фрагмент, и второго амфипатического липида, содержащего фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ), в молярном соотношении 97 : 3 (9 : 1 мас./мас.), например, молярном соотношении 97 : 3 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ2000) или в скорректированном по массе соотношении, если используется эквивалентное молярное соотношение более тяжелого пегилированного липида, например, в соотношении (мас./мас.) от 4 : 1 до 5 : 1 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ5000).
- разбавитель, такой как буфер (предпочтительно с физиологически приемлемым рН, например, рН от 6,5 до 7,2), например, цитратный буфер, необязательно в концентрации 50 мМ.

В соответствии с другим вариантом реализации предложена композиция для применения в лечении гемофилии А у субъекта, который получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII), которая имеет следующий состав:

- 5
- коллоидные частицы, состоящие из первого амфипатического липида, содержащего фосфатидилхолиновый фрагмент, и второго амфипатического липида, содержащего фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ), в молярном соотношении 97 : 3 (9 : 1 мас./мас.),
- 10
- например, молярном соотношении 97 : 3 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ2000) или в скорректированном по массе соотношении, если используется эквивалентное молярное соотношение более тяжелого пегилированного липида, например, в
- 15
- соотношении (мас./мас.) от 4 : 1 до 5 : 1 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфолина (ПОФХ) и N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДСФЭ-ПЭГ5000). Коллоидная частица дополнительно содержит неионное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитана,
- 20
- полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтиленлаурилового эфира, например, полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата;
- разбавитель, такой как буфер (предпочтительно с физиологически приемлемым рН, например, рН от 6,5 до 7,2), например, цитратный буфер, необязательно в концентрации 50 мМ.

25

Предпочтительные особенности для второго и последующих аспектов изобретения являются такими же, как и для первого аспекта с соответствующими изменениями.

30

Далее настоящее изобретение будет описано со ссылкой на следующие примеры, которые представлены в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничения изобретения. Также делается ссылка на следующие графические материалы, на которых:

35

На ФИГ.1 показано внутривенное введение FVIII с увеличенным периодом полувыведения в сравнении с подкожно вводимым FVIII. Внутривенное введение FVIII с увеличенным периодом полувыведения либо приводит к бесполезному расходованию FVIII (заштрихованная область выше линии, соответствующей 10%), либо оставляет пациента с субтерапевтическими уровнями FVII (заштрихованная область ниже этой линии). Применение депо, доставленного подкожно, может привести к более экономичному и безопасному плато содержания циркулирующего

40

FVIII. Для определения подходящего п/к режима дозирования (размера дозы и частоты введения) требуются как период полувыведения, так и относительная биодоступность.

## ПРИМЕРЫ

В примерах применяют следующий состав PEGLip

Ингредиент (г на 100 г)	PEGLip (PLP-00)
ПОФХ	8,333
мПЭГ-2000-ДСФЭ	0,926
Полисорбат 80	0
Дигидрат цитрата натрия	1,47
Вода	89,271
Всего	100
pH	6,5–7,2

5

### Пример 1

Исследования в/в и п/к введения PEGLip-FVIII у собак с гемофилией

10

#### Исследуемые объекты

FVIII: Nuwiq™ (Octapharma, флаконы 500 ME); PEGLip: 9% пегелированных липосом в 50 mM цитратном буфере, pH 6,7 (серия 19-740)

SubcutAte (3,5 мл 9% PEGLip на флакон 500 ME Nuwiq™ FVIII: 143 ME/мл PEGLip-FVIII)

15

#### Способ

##### Внутривенное введение PEGLip-FVIII

PEGLip-FVIII в дозе 50 ME/кг FVIII, 31,5 мг/кг PEGLip и 50 ME/кг FVIII (соотношение коллоидная частица : молекула FVIII — 16 : 1) вводили собакам с гемофилией А в Университете Куинс в Кингстоне (Канада) путем медленной инфузии в головную вену. Образцы венозной крови брали из головной вены через 30 минут, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 и 56 ч для определения времени свертывания цельной крови (BCЦК), проведения ротационной тромбоэластометрии (РОТЭМ), оценки уровней активности FVIII:C, проведения общего анализа крови (ОАК) и биохимического анализа крови. Также собирали кровь для анализа Бетезда через 1 и 2 недели после лечения.

25

##### Подкожное введение

PEGLip-FVIII в дозе 200 ME/кг FVIII, 126 мг/кг PEGLip и 200 ME/кг FVIII (соотношение коллоидная частица : молекула FVIII — 16 : 1) вводили собакам с гемофилией А в Университете Куинс в Кингстоне (Канада) путем подкожной (п/к) инъекции в холку. Образцы венозной крови брали из головной вены через 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 и 72 ч для определения времени свертывания цельной крови (BCЦК), проведения ротационной тромбоэластометрии (РОТЭМ), оценки уровней активности FVIII:C, проведения общего анализа крови (ОАК) и

30

биохимического анализа крови. Также собирали кровь для анализа Бетезда через 1 и 2 недели после лечения.

## **Результаты**

5

### **Коррекция свертывания крови**

Однократное внутривенное введение PEGlip-FVIII существенно сокращало время свертывания через 30 минут после введения, и этот эффект не возвращался к исходному уровню через 56 часов. Обычно ожидается, что подкожно вводимый FVIII будет минимально биодоступным и неэффективным для уменьшения времени свертывания. Напротив и неожиданно, подкожно введенный PEGlip-FVIII в этом эксперименте быстро становился биодоступным и уменьшал время свертывания, начиная с первого времени оценки через 1 час.

### **Биодоступность и период полувыведения**

Биодоступность и период полувыведения анализировали, наблюдая за ослаблением снижения времени свертывания (CTR) в течение первых 48 часов после введения дозы по данным анализа времени свертывания цельной крови (BCЦК) или по данным РОТЭМ (время свертывания (CT) плюс время образования сгустка (CFT)).

20

Для подкожной дозы PEGlip-FVIII расчетная биодоступность составила до 23%. За исключением оценки п/к дозы, проведенной с помощью анализа BCЦК, оценки периода полувыведения значительно превышали литературные данные по оценкам периода полувыведения Nuwiq™, составляющим 15,1–17,1 часа. См. Таблицу 1.

25

Комбинация биодоступности и периода полувыведения позволила авторам изобретения получить потенциальные схемы подкожного введения, включающие размер дозы и интервал между введениями, которые предотвратили бы снижение уровней FVIII до опасного уровня (см. Фиг. 1).

30

**Таблица 1**

Введение	Ослабление CTR по данным анализа BCЦК		Ослабление CTR по данным РОТЭМ	
	В/в	П/к	В/в	П/к
$t_{1/2}$ (ч)	51,0	14,0	52,5	55,0
AUC <sub>0-inf</sub>	613,5	219,9	5213,8	4832,6
Биодоступность	9%		23%	

### **Выработка ингибиторов**

В обычной практике при внутривенном введении человеческого FVIII у собак с гемофилией в этой колонии всегда будут вырабатываться антитела к человеческому FVIII с различными титрами в период от 10 дней до 4 недель после введения FVIII. Однако в этом отчете об исследовании у субъекта, получившего в/в дозу, ингибиторы не вырабатывались. Это удивительно и очень необычно для животного, которому вводят человеческий белок.

У животных, получавших п/к дозу, наблюдались низкие уровни ингибиторов от 4 до 17 БЕ, но они были ниже, чем обычно можно было бы ожидать при внутривенном введении (в типичном случае 50–100 БЕ) и на фоне большой дозы 200 МЕ/кг белка от другого биологического вида, доставляемого в одном большом объеме в иммуногенную ткань. Это может свидетельствовать о том, что даже однократная высокая доза PEGLiP-FVIII, вводимая п/к, была менее иммуногенной, чем можно было бы ожидать при эквивалентной в/в дозе только rhFVIII.

Эти неожиданные результаты свидетельствуют о том, что, без ущерба для активности FVIII и без модификации эпитопов на белке, применение PEGLiP в качестве агента для совместного введения с FVIII способно предотвращать или уменьшать выработку ингибиторов у субъектов, у которых обычно ожидался бы иммунный ответ. Это указывает на то, что совместное введение PEGLiP с FVIII снижает иммуногенность последнего, делая его более безопасной альтернативой для ранее не получавших лечения пациентов или пациентов, получавших минимальное лечение, у которых еще не вырабатывались ингибиторы.

25

### **Пример 2**

Клиническое исследование SelectAte™

Продолжаются исследования с целью продемонстрировать, что PEGLiP-FVIII в определенном соотношении восстанавливает свертываемость крови у пациентов с ингибиторной формой заболевания.

У пациентов с ГА и склонностью к выработке ингибиторов при введении PEGLiP : FVIII не происходила выработка ингибиторов, и при этом наблюдалась коррекция свертываемости крови.

В исследовании участвовали четыре пациента с тяжелой формой гемофилии, в анамнезе которых имелась выработка ингибиторных антител к FVIII. Из-за своего анамнеза эти пациенты не могут получать замещающий FVIII в качестве профилактической терапии в связи с риском выработки ингибиторов. В исследовании у трех из этих пациентов ингибиторы

первоначально отсутствовали, а у одного наблюдался низкий титр (< 5 БЕ). Всем пациентам вводили PEGLiP-FVIII в дозе 22 мг/кг PEGLiP и 35 МЕ/кг рекомбинантного гуманизированного FVIII (соотношение частица : FVIII от 15 : 1 до 16 : 1). В течение первой недели оценки у всех пациентов наблюдалась значимая коррекция свертываемости крови, что позволяло им применять препарат в среднем каждые 6 дней (диапазон 4–7 дней) в течение следующих 6 недель. Несмотря на повторное введение дозы один раз в неделю в течение 6 недель, ни у одного из трех пациентов, склонных к выработке ингибиторов, у которых не было ингибиторов, не произошла выработка ингибиторов в ответ на лечение. У одного пациента, у которого присутствовали ингибиторы с низким титром, наблюдалось небольшое, клинически незначимое повышение во время первой стадии, которое фактически уменьшилось во время введения повторных доз на второй стадии. Предполагается, что неспособность PEGLiP-FVIII вызывать образование ингибиторов у лиц, склонных к выработке ингибиторов, делает продукт исключительно пригодным для лечения ранее не получавших лечение пациентов или пациентов, получавших минимальное лечение, для предотвращения выработки ингибиторов у этих уязвимых лиц.

**Таблица 2**

Пациенты с ингибиторной формой тяжелой ГА (N = 4)	Среднее (СО)	Медиана (мин; макс)
Частота инъекций PEGLiP-FVIII, определенная на стадии А (дни)	6,0 (1,4)	6,5 (4,0; 7,0)
Частота инъекций PEGLiP-FVIII, вводимых во время стадии В (дни)	5,1 (1,2)	5,2 (3,6; 6,3)
Эпизоды спонтанных кровотечений в анамнезе в течение 24 недель перед включением в исследование (эпизоды/месяц)	0,9 (0,4)	0,8 (0,5; 1,3)
Эпизоды спонтанных кровотечений, оцененные во время стадии В (эпизоды/месяц) <i>- у 3 из 4 пациентов не было спонтанных кровотечений</i>	0,5 (0,9)	0,0 (0,0; 0,9)
Антитела к FVIII (единицы Бетезда) — скрининг	1,1 (2,2)	0,0 (0,0; 4,4)
Антитела к FVIII (единицы Бетезда) — конец стадии А	2,0 (4,0)	0,0 (0,0; 8,0)
Антитела к FVIII (единицы Бетезда) — конец стадии В	1,7 (3,4)	0,0 (0,0; 6,8)

20

**Пример 3**

Клиническое исследование PEGLiP + FVIII у пациентов, склонных к выработке ингибиторов и имеющих ингибиторы

25 Было проведено клиническое исследование II фазы, чтобы продемонстрировать, что PEGLiP-FVIII восстанавливает свертывание крови у пациентов, склонных к выработке ингибиторов, и пациентов, имеющих ингибиторы, не стимулируя выработку ингибиторов у пациентов, склонных к выработке ингибиторов, и не вызывая повышения титра ингибиторов у пациентов, имеющих ингибиторы. Исследование было основано на результатах, описанных в Примере 2.

У пациентов с тяжелой ГА, у которых либо имелись ингибиторы при скрининге, либо их клинический анамнез свидетельствовал, что они склонны к выработке ингибиторов при воздействии FVIII, не повышался титр ингибиторов или не вырабатывались ингибиторы, соответственно, при введении PEGLiP + FVIII (PLP-00 + симоктоког альфа), при этом у них наблюдались коррекция свертывания крови и снижение частоты кровотечений.

В исследовании участвовали тринадцать пациентов с тяжелой формой гемофилии, в анамнезе которых имелась выработка ингибиторных антител к FVIII. Из-за своего анамнеза восемь из этих пациентов не могут получать замещающий FVIII в качестве профилактической терапии в связи с риском выработки ингибиторов. У остальных 5 пациентов при скрининге наблюдались титры активных ингибиторов (среднее значение 2,4 единицы Бетезда). Всем пациентам вводили PEGLiP + FVIII (симоктоког альфа) в дозе 22 мг/кг PEGLiP и 35 МЕ/кг рекомбинантного гуманизированного FVIII (соотношение коллоидная частица : FVIII от 15 : 1 до 16 : 1). В течение первой недели оценки у всех пациентов наблюдалась значимая коррекция свертываемости крови, что позволяло им принимать препарат в среднем каждые 5,5 дня (диапазон 3,0–7,4 дня) в течение следующих 6 недель, что представляет собой значимое удлинение интервала дозирования (нормальный интервал дозирования для симоктоктога альфа составляет через день или 2–3 раза в неделю). Несмотря на эту более низкую частоту дозирования, случаи кровотечений у пациентов значимо уменьшились, при этом среднемесячная частота кровотечений снизилась в среднем с 1 в месяц (12,3 в год) до 0,3 в месяц (3,2 в год).

Несмотря на повторное введение дозы один раз в неделю в течение 6 недель, ни у одного из восьми пациентов, склонных к выработке ингибиторов, у которых не было ингибиторов, не произошла выработка ингибиторов в ответ на лечение. Кроме того, у пяти пациентов, у которых имелись ингибиторы, не наблюдалось значимого повышения титра ингибиторов в течение 6-недельной профилактической стадии этого исследования. Предполагается, что, наряду с лечением пациентов, имеющих ингибиторы, и пациентов, склонных к выработке ингибиторов, неспособность PEGLiP-FVIII вызывать образование ингибиторов у лиц, склонных к выработке ингибиторов, дополнительно сделает продукт исключительно пригодным для лечения ранее не получавших лечение пациентов или пациентов, получавших минимальное лечение, для предотвращения выработки ингибиторов у этих уязвимых лиц.

35

40

Таблица 3

	Пациенты с ингибиторной формой заболевания. Активные ингибиторы отсутствуют	Пациенты с ингибиторной формой заболевания. Активные ингибиторы при скрининге	Всего пациентов с ингибиторной формой заболевания
n =	8	5	13
<b>Титры Бетезда (единицы)</b>			
<b>При скрининге</b>			
Среднее (СО), единицы	0,0 (0)	2,4 (1,3)	0,9 (1,4)
Медиана [мин.; макс.], единицы	0,0 [0; 0]	2,0 [1,3; 4,4]	0,0 [0,0; 4,4]
<b>В конце стадии А</b>			
Среднее (СО), единицы	0,0 (0)	2,5 (3,1)	1,0 (2,2)
Медиана [мин.; макс.], единицы	0,0 [0; 0]	1,1 [1,0; 8,0]	0,0 [0,0; 8,0]
<b>В конце стадии В</b>			
Среднее (СО), единицы	0,0 (0)	2,4 (2,5)	0,9 (1,9)
Медиана [мин.; макс.], единицы	0,0 [0; 0]	1,3 [0,9; 6,8]	0,0 [0,0; 6,8]
<b>Изменение (стадия В – скрининг)</b> (р-значение)	0 не вычисляли	0 p = 0,975	0,0 p > 0,999
<b>Частота инъекций PEGLiP-FVIII, вводимых во время стадии В (дни)</b>			
Среднее (СО)			5,5 (1,3)
Медиана [мин.; макс.]			5,5 [3,0; 7,4]
<b>Количество эпизодов кровотечения в месяц</b>			
<b>24 недели до зачисления</b>			
Среднее (СО)	0,9 (0,3)	1,2 (0,2)	1,0 (0,3)
Медиана [мин.; макс.]	1,0 [0,5; 1,3]	1,3 [0,8; 1,3]	1,0 [0,5; 1,3]
<b>Во время стадии В</b>			
Среднее (СО)	0,2 (0,7)	0,3 (0,4)	0,3 (0,6)
Медиана [мин.; макс.]	0,0 [0,0; 1,9]	0,0 [0,0; 0,8]	0,0 [0,0; 1,9]
<b>Среднее (стадия В – скрининг)</b> (р-значение)	-0,7	-0,9	-0,8 p < 0,005

**Вывод**

Соотношение PEGLiP и FVIII от 15 : 1 до 16 : 1 снижает риск развития кровотечений у 5 пациентов с ингибиторами к FVIII, а также у пациентов, склонных к выработке ингибиторов к FVIII, не стимулируя выработку дополнительных значительных количеств ингибиторов.

**Пример 4**

Клиническое исследование усиления действия FVIII с помощью PEGLiP у пациентов без 10 ингибиторов

5 Было проведено клиническое исследование II фазы, чтобы продемонстрировать, что PEGlip, вводимая после профилактической дозы FVIII, позволяет безопасно увеличить интервал дозирования между профилактическими дозами FVIII с сохранением способности предотвращать эпизоды кровотечения, и тем самым снижается воздействие FVIII на пациентов.

10 Участвовали четырнадцать пациентов с тяжелой формой гемофилии без ингибиторов. Всем пациентам вводили внутривенно FVIII (симоктоког альфа) в дозе 35 ME/кг, после чего через 15 минут проводили однократную внутривенную инфузию PEGlip в дозе 22 мг/кг.

15 В течение первой недели оценки у всех пациентов наблюдалась значимая коррекция свертываемости крови, что позволяло им принимать препарат в среднем каждые 4,9 дня (диапазон 3,1–7,3 дня) в течение следующих 6 недель, что представляет собой значимое удлинение интервала дозирования (нормальный интервал дозирования для симоктокога альфа составляет через день или 2–3 раза в неделю).

20 Несмотря на эту более низкую частоту дозирования, случаи кровотечений у пациентов значимо уменьшились, при этом среднемесячная частота кровотечений снизилась в среднем с 1,10 в месяц (13,21 в год) до 0,18 в месяц (2,21 в год).

За 6 недель профилактического лечения ни у одного из пациентов не выработались ингибиторы к FVIII.

25 Предполагается, что способность PEGlip при последующем введении после FVIII, вводимого в соответствии с нормальным стандартом лечения пациента, продлевать интервал дозирования этого FVIII подобным образом может вдвое сократить количество воздействий FVIII на ранее не получавших лечение/получавших минимальное лечение пациентов, снижая возможность развития иммунного ответа.

30 **Таблица 4**

	Анамнез (за 24 недели до включения в исследование)	Стадия В (6 недель)	Разность
n	14	14	14
<b>Месячная частота кровотечений (эпизодов/месяц)</b>			
Среднее (СО)	1,10 (0,64)	0,18 (0,37)	-0,92 (0,63)
Медиана [мин.; макс.]	1,08 [0,58; 1,58]	0,00 [0,00; 0,00]	-0,96
<i>вероятность</i>			<i>p = 0,019</i>

<b>Интервал дозирования во время стадии В (дни)</b>			
Среднее (СО)	1,08 [0,25; 2,00]	4,9 (1,4)	
Медиана [мин.; макс.]		0,00 [0,00; 1,09]	

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая коллоидную частицу, содержащую (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из  
5 фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ),

причем указанный второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером,

для применения при лечении гемофилии А у субъекта,

при этом указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии  
10 фактором VIII (FVIII).

2. Композиция для применения по п. 1, отличающаяся тем, что указанный биосовместимый гидрофильный полимер выбран из группы, состоящей из полиалкиловых эфиров, полимолочных кислот и полигликолевых кислот.

3. Композиция для применения по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что указанный  
15 биосовместимый гидрофильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ).

4. Композиция для применения по п. 3, отличающаяся тем, что указанный полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Дальтон.

5. Композиция для применения по п. 4, отличающаяся тем, что указанный полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу от приблизительно 2000 Дальтон до приблизительно  
20 5000 Дальтон.

6. Композиция для применения по любому из пп. 1–5, отличающаяся тем, что указанный фосфолипид представляет собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ).

7. Композиция для применения по любому из пп. 1–6, отличающаяся тем, что указанный  
25 фосфолипид представляет собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ2000) или N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ5000).

8. Композиция для применения по любому из пп. 1–7, отличающаяся тем, что указанный  
30 фосфатидилхолин (ФХ) представляет собой 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ).

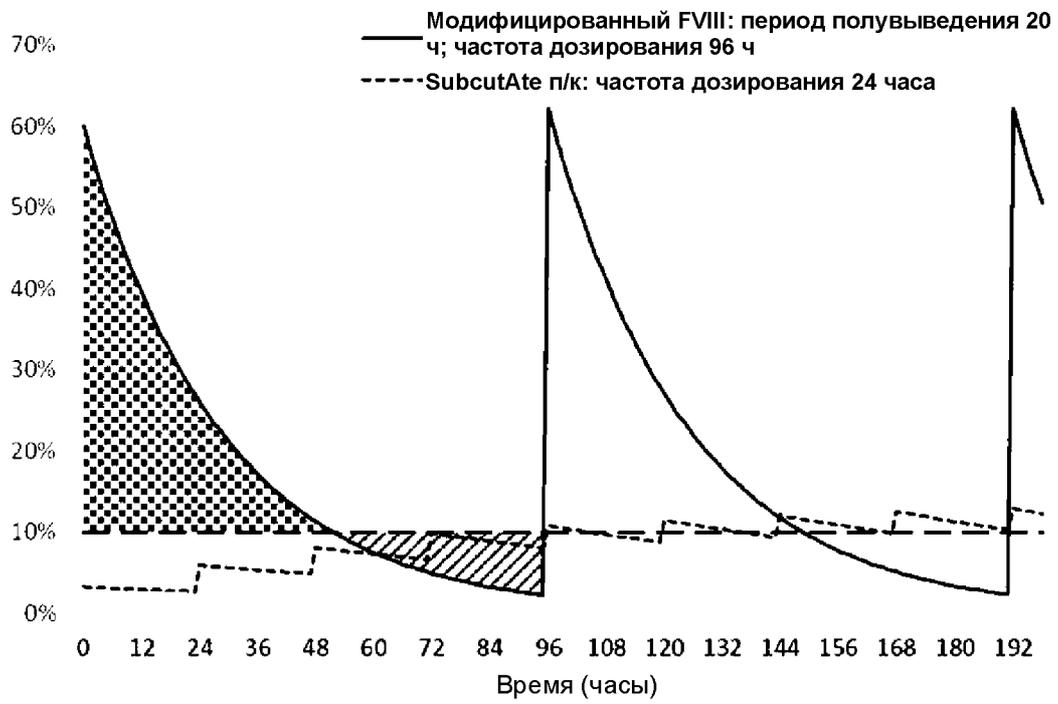
9. Композиция для применения по любому из пп. 1–8, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит первый амфипатический липид и второй амфипатический липид в молярном соотношении от 90 до 99 : от 10 до 1.
- 5 10. Композиция для применения по п. 9, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит первый амфипатический липид и второй амфипатический липид в молярном соотношении 97 : 3.
- 10 11. Композиция для применения по любому из пп. 1–10, отличающаяся тем, что указанная коллоидная частица дополнительно содержит (iii) неионное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитана, полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтиленлаурилового эфира.
12. Композиция для применения по п. 11, отличающаяся тем, что указанное неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат.
- 15 13. Композиция для применения по п. 11 или п. 12, отличающаяся тем, что указанная коллоидная частица содержит первый амфипатический липид и второй амфипатический липид в соотношении с неионным поверхностно-активным веществом от 30 : 1 до 2 : 1 (мас./мас.).
- 20 14. Композиция для применения по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит первый амфипатический липид и второй амфипатический липид и неионное поверхностно-активное вещество в соотношении от 10 до 40 : 1 : от 0 до 4 (мас./мас.).
15. Композиция для применения по любому из пп. 1–14, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит молекулу фактора VIII (FVIII).
- 25 16. Композиция для применения по п. 15, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит коллоидную частицу и молекулу фактора VIII (FVIII) в стехиометрическом соотношении от 1 до 90 : 1.
17. Композиция для применения по п. 15 или п. 16, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит коллоидную частицу и молекулу фактора VIII (FVIII) в стехиометрическом соотношении от 10 до 20 : 1 или от 5 до 10 : 1.
- 30 18. Композиция для применения по любому из пп. 1–17, отличающаяся тем, что гемофилия А представляет собой врожденную гемофилию А (ВГА).
19. Композиция для применения по любому из пп. 1–17, отличающаяся тем, что гемофилия А представляет собой приобретенную гемофилию А (ПГА).

20. Композиция для применения по любому из пп. 1–19, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит терапевтически активное соединение.
21. Композиция для применения по любому из пп. 1–20, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит вспомогательное вещество, разбавитель или адъювант.
- 5 22. Композиция для применения по любому из пп. 1–21, отличающаяся тем, что указанный субъект представляет собой субъекта детского возраста.
23. Композиция для применения по любому из пп. 1–22, отличающаяся тем, что указанный субъект не получал терапию FVIII.
24. Способ лечения гемофилии А у субъекта, включающий стадию:
- 10 введение композиции, содержащей коллоидную частицу, содержащую (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ),
- 15 причем указанный второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером, и
- при этом указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный биосовместимый гидрофильный
- 20 полимер выбран из группы, состоящей из полиалкиловых эфиров, полимолочных кислот и полигликолевых кислот.
26. Способ по п. 24 или п. 25, отличающийся тем, что указанный биосовместимый гидрофильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ).
27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанный полиэтиленгликоль имеет
- 25 молекулярную массу от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Дальтон.
28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанный полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу от приблизительно 2000 Дальтон до приблизительно 5000 Дальтон.
29. Способ по любому из пп. 24–28, отличающийся тем, что указанный фосфолипид представляет собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-
- 30 фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ).

30. Способ по любому из пп. 24–29, отличающийся тем, что указанный фосфолипид представляет собой N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ2000) или N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-5000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДСФЭ-ПЭГ5000).
- 5 31. Способ по любому из пп. 24–30, отличающийся тем, что указанный фосфатидилхолин (ФХ) представляет собой 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ).
32. Способ по любому из пп. 24–31, отличающийся тем, что указанная коллоидная частица дополнительно содержит (iii) неионное поверхностно-активное вещество.
- 10 33. Способ по любому из пп. 24–32, отличающийся тем, что указанная композиция дополнительно содержит молекулу фактора VIII (FVIII).
34. Способ по любому из пп. 24–32, отличающийся тем, что указанный способ включает дополнительную стадию отдельного или последовательного введения композиции, содержащей молекулу фактора VIII (FVIII).
- 15 35. Способ по любому из пп. 24–34, отличающийся тем, что гемофилия А представляет собой врожденную гемофилию А (ВГА).
36. Способ по любому из пп. 24–34, отличающийся тем, что гемофилия А представляет собой приобретенную гемофилию А (ПГА).
37. Способ по любому из пп. 24–36, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой субъекта детского возраста.
- 20 38. Способ по любому из пп. 24–37, отличающийся тем, что указанный субъект не получал терапию FVIII.
- 25 39. Набор, содержащий (i) композицию, содержащую коллоидную частицу, и (ii) композицию, содержащую молекулу фактора VIII (FVIII), для применения при лечении гемофилии А у субъекта, причем указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII), при этом указанная коллоидная частица содержит (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ),
- 30 причем указанный второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером.

40. Набор по п. 39, отличающийся тем, что указанная коллоидная частица дополнительно содержит (iii) неионное поверхностно-активное вещество.
41. Набор, содержащий (i) композицию, содержащую коллоидную частицу, и (ii) композицию, содержащую молекулу фактора VIII (FVIII), для отдельного, одновременного или последовательного применения при лечении гемофилии А у субъекта, при этом указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII),
- 5
- 10 причем указанная коллоидная частица содержит (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ),
- 10
- 15
- 20
- 25
42. Набор по п. 41, отличающийся тем, что указанная коллоидная частица дополнительно содержит (iii) неионное поверхностно-активное вещество.
43. Лекарственная форма фармацевтической композиции, содержащей коллоидную частицу, содержащую (i) первый амфипатический липид, содержащий фосфатидилхолиновый (ФХ) фрагмент, и (ii) второй амфипатический липид, содержащий фосфолипидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ),
- 15
- 20
- 25
- причем указанный второй амфипатический липид содержит фосфолипидный фрагмент, дериватизированный биосовместимым гидрофильным полимером,
- для применения при лечении гемофилии А у субъекта,
- при этом указанный субъект получил менее 50 дней воздействия в рамках терапии фактором VIII (FVIII).
44. Лекарственная форма по п. 43, отличающаяся тем, что указанная коллоидная частица дополнительно содержит (iii) неионное поверхностно-активное вещество.

## Относительная концентрация в крови в динамике



Фиг. 1