



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I700101 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：104109389

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 24 日

(51)Int. Cl. : A61K9/19 (2006.01)

A61K38/36 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2014/03/24 美國

61/969,801

(71)申請人：美商百歐維拉提夫治療公司 (美國) BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (US)
美國(72)發明人：湯瑪 布萊恩 THOME, BRIAN M. (US)；帕赫斯連 查理 PARKHURST-LANG,
CHERIE (US)；維萊利 布萊登 LEVEILLE, BRANDON W. (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

(56)參考文獻：

US 2001/0038859A1

HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION FOR ALPROLIX, BIOGEN IDEC
INC., March 1, 2014。【網址：[http://www.fffenterprises.com/assets/
downloads/pi-Factor%209-Recombinant_ALPROLIX_Biogen%20Idex.pdf](http://www.fffenterprises.com/assets/downloads/pi-Factor%209-Recombinant_ALPROLIX_Biogen%20Idex.pdf)】。

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 93 頁

(54)名稱

凍乾之因子 I X 調配物

(57)摘要

本發明尤其提供包含因子 IX(FIX)多肽之預凍乾調配物、復原調配物及凍乾物粉末組合物。本發明亦提供用於生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末的凍乾法。

The present invention provides, among other things, pre-lyophilization formulations, reconstituted formulations, and lyophilate powder compositions comprising a Factor IX (FIX) polypeptide. The present invention also provides lyophilization methods for producing lyophilate powder comprising a FIX polypeptide.

I700101

發明摘要

※申請案號：104109389

※申請日：104 年 03 月 24 日

※IPC 分類：
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

凍乾之因子 IX 調配物

Lyophilized factor IX formulations

【中文】

本發明尤其提供包含因子 IX (FIX)多肽之預凍乾調配物、復原調配物及凍乾物粉末組合物。本發明亦提供用於生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末的凍乾法。

【英文】

The present invention provides, among other things, pre-lyophilization formulations, reconstituted formulations, and lyophilate powder compositions comprising a Factor IX (FIX) polypeptide. The present invention also provides lyophilization methods for producing lyophilate powder comprising a FIX polypeptide.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

凍乾之因子 IX 調配物

Lyophilized factor IX formulations

【技術領域】

[0001] 本發明大體上係關於止血障礙治療劑領域。

【先前技術】

[0002] B 型血友病(亦稱為克雷司馬斯病)為世界上最常見之遺傳性出血病症之一。其導致活體內及活體外血液凝固活性降低且在受影響個體之整個生命週期中均需要廣泛醫療監護。在不存在介入之情況下，受折磨之個體將遭受關節中自發性出血，由此造成嚴重疼痛及衰弱性不活動；血流入肌肉中造成血液在彼等組織中累積；若不立即治療，則喉部及頸部自發性出血可造成窒息；且手術、輕微意外傷害或拔牙後嚴重出血亦是盛行的。

[0003] 最低程度之正常活體內血液凝固需要絲胺酸蛋白酶因子 II (凝血酶原)、VII、IX、X 及 XI (可溶性血漿蛋白)；輔因子，包括跨膜蛋白組織因子及血漿蛋白因子 V 及 VIII；纖維蛋白原、轉麩醯胺酸酶因子 XIII、磷脂(包括活化之血小板)及鈣。其他蛋白質，包括激肽釋放酶、高分子量激肽原及因子 XII，為一些活體外凝結測試

需要的，且在病理狀態下可在活體內起重要作用。

[0004] 在血友病中，血液凝固因缺乏某些血漿凝血因子受干擾。B 型血友病係由可由因子 IX 蛋白合成減少或缺陷分子活性降低引起之因子 IX 缺乏造成。血友病之治療係藉由以高度富含因子 IX 之外源性因子濃縮物置換錯誤凝結因子來進行。然而，如下文所描述，由血液產生此種濃縮物充滿技術困難。

[0005] 自血漿純化因子 IX (血漿衍生之因子 IX；pdFIX)幾乎僅產生活性因子 IX。然而，此種自血漿純化因子 IX 非常困難，因為因子 IX 僅以低濃度存在於血漿中 (5 $\mu\text{g/mL}$ ；Andersson, Thrombosis Research 7: 451-459 (1975))。此外，自血液純化需要移除或滅活諸如 HIV 及 HCV 之傳染劑。另外，pdFIX 具有短半衰期且因此需要頻繁投藥。重組因子 IX (rFIX)亦可利用，但與 pdFIX 一樣受較短半衰期及需要頻繁投藥(例如每週 2 至 3 次用於預防)困擾。與 pdFIX 相比，rFIX 亦具有較低增量回收率(K 值)，使得有必要使用高於 pdFIX 劑量之 rFIX 劑量。

[0006] 由於開發出血漿衍生之因子 IX 及重組因子 IX，降低死亡率、預防關節損傷及改良生活品質已成為重要成就。長期防止出血將代表治療 B 型血友病個體之另一關鍵進步。然而，迄今為止，尚未開發出允許長期防護之產品。因此，仍需要比當前療法更具耐受性且更有效之治療由於因子 IX 缺乏所致之血友病之改良方法。

[0007] 特定言之，仍需要具有較高藥品強度、較長

貨架壽命、較少凍乾制程時間及較短復原時間之改良之凍乾 FIX 調配物。

【發明內容】

[0008] 本發明係針對一種預凍乾調配物，其包含：(a)因子 IX (FIX)多肽，其具有 FIX 凝結活性；(b)緩衝劑；(c)穩定劑；(d)增積劑；及(e)界面活性劑，其中該調配物所具有之填充體積小於約 5 mL、小於約 4 mL 或小於約 3 mL，且其中與參考預凍乾調配物相比，(a)至(e)中每一者之每小瓶之量(mg/小瓶)足以允許(1)當凍乾時改良 FIX 多肽之穩定性；(2)當凍乾時減少復原時間；(3)減少潑灑至包含該調配物之封塞上；(4)減少凍乾循環時間；(5)增加由該預凍乾調配物製備之凍乾物在室溫下之貨架壽命；或(6)其任何組合，其中該參考調配物所包含之(a)至(e)之每小瓶之量與該預凍乾調配物相同，但具有至少 5 mL 填充體積。在一特定實施例中，該調配物之填充體積為約 2.65 mL。

[0009] 在一些實施例中，該預凍乾調配物包含至少 100 IU/小瓶之 FIX 多肽。在一些實施例中，該預凍乾調配物包含約 200 IU/小瓶至約 10,000 IU/小瓶之 FIX 多肽。

[0010] 在一些實施例中，該 FIX 多肽包含野生型 FIX。在一些實施例中，該 FIX 多肽進一步包含與野生型 FIX 融合之異源部分。在一個實施例中，該異源部分為延長 FIX 之半衰期的部分。在另一實施例中，該異源部分包

含多肽或非多肽部分。在一個實施例中，該延長 FIX 之半衰期之部分包含 FcRn 結合搭配物或 Fc 區。在一個實施例中，該 FIX 多肽與 SEQ ID NO: 2 具有至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%或 100%一致性。

[0011] 在一些實施例中，該填充體積為約 4 mL、約 3.5 mL、約 3.0 mL、約 2.9 mL、約 2.8 mL、約 2.7 mL、約 2.65 mL、約 2.6 mL、約 2.5 mL、約 2.4 mL、約 2.3 mL、約 2.2 mL、約 2.1 mL 或約 2.0 mL。

[0012] 在一些實施例中，該減少之復原時間少於 1.5 分鐘、少於 1 分鐘、少於 50 秒、少於 40 秒、少於 30 秒、少於 20 秒或少於 10 秒。

[0013] 在一些實施例中，該緩衝劑為 L-組胺酸。在一個實施例中，該緩衝劑之濃度(mg/mL)介於約 3 mg/mL 與約 15 mg/mL 之間。在另一實施例中，該緩衝劑之濃度介於每小瓶約 8 mg 與約 39 mg 之間。

[0014] 在一些實施例中，該穩定劑為蔗糖。在一個實施例中，該穩定劑之濃度(mg/mL)介於 10 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間。在另一實施例中，該穩定劑之濃度介於每小瓶約 27 mg 與約 132 mg 之間。

[0015] 在一些實施例中，該增積劑為甘露醇。在一個實施例中，該增積劑之濃度(mg/mL)介於 20 mg/mL 與約 100 mg/mL 之間。在另一實施例中，該增積劑之濃度介於每小瓶約 53 mg 與每小瓶約 265 mg 之間。

[0016] 在一些實施例中，該界面活性劑為聚山梨醇

酯 20。在一個實施例中，該界面活性劑之濃度(mg/mL)介於 0.01 mg/mL 與約 5 mg/mL 之間。在另一實施例中，該界面活性劑之濃度介於每小瓶約 0.03 mg 與約 13 mg 之間。

[0017] 在一個態樣中，本發明係針對預凍乾調配物，其包含：(a)約 80 至約 2,750 IU/mL rFIXFc；(b)約 7.76 mg/mL L-組胺酸；(c)約 47.6 mg/mL 甘露醇；(d)約 23.8 mg/mL 蔗糖；及(e)約 0.2 mg/mL 聚山梨醇酯-20。

[0018] 本發明進一步針對包含 FIX 多肽、緩衝劑、穩定劑、增積劑、界面活性劑或其任何組合之凍乾物粉末。

[0019] 在一些實施例中，該凍乾物粉末之殘餘水分含量低於 1%。

[0020] 在一個實施例中，該凍乾物粉末包含：(a) FIX 多肽，其量介於每小瓶約 2 mg 與每小瓶約 150 mg 之間；(b)緩衝劑，其量介於每小瓶 10 mg 與每小瓶約 30 mg 之間；(c)增積劑，其量介於每小瓶 70 mg 與每小瓶約 200 mg 之間；(d)穩定劑，其量介於每小瓶 30 mg 與每小瓶 100 mg 之間；及(e)界面活性劑，其量介於每小瓶 0.05 mg 與每小瓶約 5 mg 之間。

[0021] 在另一實施例中，該凍乾物粉末包含：(a)凍乾之 FIX 多肽，其量介於每小瓶約 2.2 mg 與每小瓶約 125 mg 之間；(b)緩衝劑，其量介於每小瓶約 12.5 mg 與每小瓶 25 mg 之間；(c)穩定劑，其量介於每小瓶約 32.5 mg 與

每小瓶 80 mg 之間；(d)增積劑，其量介於每小瓶約 75 mg 與每小瓶 150 mg 之間；及(e)界面活性劑，其量介於約 0.1 mg/mL 與約 2 mg/mL 之間。

[0022] 在另一實施例中，該凍乾物粉末包含：(a)約 2.2 至約 125 mg/小瓶之該 FIX 多肽；(b)約 20.6 mg/小瓶之 L-組胺酸；(c)約 126.1 mg/小瓶之甘露醇；(d)約 63.1 mg/小瓶之蔗糖；及(e)約 0.53 mg/小瓶之聚山梨醇酯-20。

[0023] 本發明亦針對一種復原調配物，其包含藉由復原緩衝液復原之本文中所描述之凍乾物粉末。

[0024] 在一個實施例中，該復原調配物包含：(a) FIX 多肽，其濃度介於約 0.9 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間；(b)緩衝劑，其濃度介於 1.5 mg/mL 與約 7.5 mg/mL 之間；(c)增積劑，其濃度介於 10 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間；(d)穩定劑，其濃度介於每小瓶 5 mg/mL 與 25 mg/mL 之間；及(e)界面活性劑，其濃度介於 0.005 mg/mL 與約 2.5 mg/mL 之間。

[0025] 在另一實施例中，該復原調配物包含：(a) FIX 多肽，其濃度介於約 0.9 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間；(b)緩衝劑，其濃度為約 3.88 mg/mL；(c)增積劑，其濃度為約 23.8 mg/mL；(d)穩定劑，其濃度為約 11.9 mg/mL；(e)界面活性劑，其濃度為約 0.1 mg/mL；及(f)復原緩衝液。

[0026] 在另一實施例中，該復原調配物包含：(a) FIX 多肽，其濃度介於約 80 IU/mL 與約 2,750 IU/mL 之

間；(b)緩衝劑，其濃度為約 25 mM；(c)增積劑，其濃度為約 131 mM；(d)穩定劑，其濃度為約 35 mM；(e)界面活性劑，其濃度為 0.01% (w/v)；及(f)復原緩衝液。

[0027] 本發明進一步係關於一種向有需要之 B 型血友病患者投與 FIX 多肽之方法，或一種預防、治療、改善或控制有需要之患者之 B 型血友病的方法，該方法包括向該患者投與本文中所描述之復原調配物。

[0028] 本發明亦係針對一種生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之方法，該方法包括將本文中所描述之預凍乾調配物凍乾。

[0029] 在一個態樣中，本發明係針對一種凍乾 FIX 多肽之方法，該方法包括：(a)「冷凍步驟」，其包括將包含該 FIX 多肽及水性溶劑之預凍乾調配物冷凍；(b)「真空步驟」，其包括使經冷凍之預凍乾調配物之壓力降低可有效地自該經冷凍之預凍乾調配物中移除該水性溶劑之量；及(c)單一「乾燥步驟」，其包括使該經冷凍之預凍乾調配物之溫度增加至高於塌陷溫度，從而產生凍乾物粉末。在一些實施例中，在步驟(a)之前將該預凍乾調配物無菌過濾且無菌填充至小瓶中。

[0030] 在另一態樣中，本發明係針對生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之方法，該方法包括：(a)「冷凍步驟」，其包括藉由使溫度歷經約 2 小時緩慢降至約 -55°C 之冷凍溫度且將該冷凍溫度保持約 2 小時來冷凍包含 FIX 多肽之預凍乾調配物；(a')「退火步驟」，其包括使步驟

(a)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度經約 1.5 小時緩慢升至約 -6°C 之退火溫度，將該退火溫度保持約 3 小時且使該溫度經約 1.5 小時緩慢降至約 -55°C ；(b)「真空步驟」，其包括將步驟(a')之經冷凍之預凍乾調配物在約 -55°C 下在大氣壓下保持 2 小時且使該壓力經約 2 小時緩慢降至約 0.33 毫巴；及(c)單一「乾燥步驟」，其包括在將壓力保持在約 0.33 毫巴的同時使步驟(b)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度經 3 小時緩慢升至約 40°C ，及在將壓力保持在約 0.33 毫巴的同時使該經冷凍之預凍乾調配物之溫度保持在約 40°C 約 25 小時，從而產生凍乾物粉末。

[0031] 在另一態樣中，該凍乾物粉末具有選自由以下組成之群的一或多種特徵：(1)當凍乾時改良 FIX 多肽之穩定性；(2)當凍乾時減少復原時間；(3)減少潑灑至包含該調配物之封塞上；(4)減少凍乾循環時間；(5)增加由該預凍乾調配物製備之凍乾物在室溫下之貨架壽命；或(6)其任何組合，

[0032] 在一個態樣中，本揭示案提供一種使包含 FIX 多肽之凍乾物粉末穩定之方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就藉由使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法製備之凍乾物粉末而言，該凍乾物粉末經穩定，如藉由尺寸排除層析法(SEC)所量測。

[0033] 在另一態樣中，本揭示案提供一種增加包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之貨架壽命之方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就藉由

使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法製備之凍乾物粉末之貨架壽命而言，該凍乾物粉末之貨架壽命有所增加，如藉由 SEC 及/或 FIX 凝結活性分析法所量測。

[0034] 本揭示案亦提供一種減少包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之復原時間的方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就藉由使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法製備之凍乾物粉末之復原時間而言，該凍乾物粉末之復原時間有所減少。

[0035] 本揭示案進一步提供一種減少生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之凍乾制程時間的方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法生產凍乾物粉末之凍乾制程時間而言，該預凍乾調配物之凍乾制程時間有所減少。

【圖式簡單說明】

[0036] 圖 1 顯示各凍乾循環之小瓶裝載模式。編號 1、2 及 3 指示熱電偶位置。

[0037] 圖 2 顯示得自於對殘餘水分與凍乾參數(溫度、真空度及時間)之函數之 DOE 分析的預測分析器。

[0038] 圖 3 顯示得自於對昇華期間之產物溫度與凍乾參數(溫度及真空度)之函數之 DOE 分析的預測分析器。

[0039] 圖 4 顯示得自於對昇華期間之小瓶品質流與凍乾參數(溫度及真空度)之函數之 DOE 分析的預測分析器。

[0040] 圖 5 顯示得自於實例 2 中之 DOE 運作 8 之凍乾資料，其類似於建議 rFIXFc-2G 凍乾循環(儲存溫度 40℃，腔室真空度 250 毫托(0.33 毫巴)及乾燥時間 25 小時)。

【實施方式】

[0041] 本揭示案尤其提供包含因子 IX (FIX)多肽之預凍乾調配物、復原調配物及凍乾物粉末組合物。本揭示案亦提供用於生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末的凍乾法。亦提供使包含 FIX 多肽之凍乾物粉末穩定之方法、增加包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之貨架壽命之方法、減少包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之復原時間之方法及減少包含 FIX 多肽之預凍乾調配物之凍乾制程時間的方法。另外，本揭示案提供藉由投與包含 FIX 多肽之復原調配物來預防、治療、改善或控制有需要之患者之 B 型血友病的方法。

定義

[0042] 貫穿本揭示案，術語「一個」或「一種」實體係指一或多個(種)該實體；舉例而言，「一個聚核苷酸」應理解為表示一或多個聚核苷酸。因而，術語「一個」(或「一種」)、「一或多個(種)」及「至少一個(種)」在本文中可互換使用。

[0043] 此外，「及/或」在用於本文中之情況下應被視作特定揭示兩個所說明之特徵或組分中之每一者而存在

或不存在另一者。因而，如諸如「A 及/或 B」之片語中所使用之術語「及/或」在本文中意欲包括「A 及 B」、「A 或 B」、「A」(單獨)及「B」(單獨)。同樣，如諸如「A、B 及/或 C」之片語中所使用之術語「及/或」意欲涵蓋以下態樣中之每一者：A、B 及 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 及 C；A 及 B；B 及 C；A (單獨)；B (單獨)；及 C (單獨)。

[0044] 應理解，在本文中以措辭「包含」描述態樣之情況下，亦提供以「由.....組成」及/或「基本上由.....組成」描述之其他類似態樣。

[0045] 除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語之含義皆與熟習本揭示案所屬領域之技術人員通常所理解之含義相同。舉例而言，生物醫學與分子生物學簡明辭典(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology), Juo, Pei-Show, 第 2 版, 2002, CRC Press；細胞與分子生物學辭典(The Dictionary of Cell and Molecular Biology), 第 3 版, 1999, Academic Press；及牛津生物化學與分子生物學辭典(the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology), 修訂版, 2000, Oxford University Press，為熟習此項技術者提供具有本揭示案中所使用之許多術語的通用詞典。

[0046] 單位、字首及符號係以其國際單位制(SI)接受之形式表示。數值範圍指示限定該範圍之數字。除非另外指出，否則胺基酸序列按胺基至羧基方向自左向右書寫。

本文中所提供之標題並非對本揭示案之各種態樣之限制，其可藉由整體參考本說明書加以理解。因此，藉由參考本說明書全文，可更全面地定義下文所定義之術語。

[0047] 術語「約」在本文中用於意謂大致、大約、左右或大略，且值將視量測系統之限制而定。當術語「約」與數值範圍聯合使用時，其藉由擴大所述數值之上下界限來改變該範圍。一般而言，術語「約」可將所述值之上下數值改變例如上下(高或低)10%或 20%之變化。除非另外陳述，否則應假定“約”之含義在調配物或組合物之特定值的可接受誤差範圍內。

[0048] 術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」可互換使用且係指由共價連接之胺基酸殘基構成之聚合化合物。

[0049] 術語「聚核苷酸」及「核酸」可互換使用，且係指由共價連接之核苷酸殘基構成之聚合化合物。聚核苷酸可為單股或雙股 DNA、cDNA、RNA、載體、質體、噬菌體或病毒。

[0050] 如本文中所使用之術語「投與」意謂例如開處方或將包含 FIX 多肽之醫藥組合物給與個體。投與途徑之實例包括但不限於靜脈內，例如靜脈內注射及靜脈內輸注，例如經由中心靜脈通路。其他投與途徑包括皮下、肌肉內、經口、經鼻及經肺投與。包含 FIX 多肽之醫藥組合物可包含一或多種如本文中所描述之賦形劑。本文中所提供之方法、組合物及醫藥套組之優勢包括：改良療法順應性；減少突破性出血；增加對關節出血之保護；防止關節

損傷；降低發病率；降低死亡率；延長出血保護；減少血栓形成事件；及改良生活品質。投藥包括非經腸投藥。在一些實施例中，非經腸投藥為靜脈內或皮下投藥。

[0051] 如本文中所使用之術語「治療」意謂改善或減少出血疾病或病症(包括但不限於 B 型血友病)之一或多種症狀。在一個實施例中，「治療」出血疾病或病症包括預防出血疾病或病症之一或多種症狀。在由 FIX 缺乏(例如低基線 FIX 活性)引起之出血疾病或病症中，術語「治療」可意謂 FIX 替代療法。藉由向個體投與 FIXFc 多肽，該個體可達成及/或維持 FIX 活性之血漿谷含量於約 1 IU/dl 或高於 1 IU/dl。在其他實施例中，「治療」意謂降低出血疾病或病症(例如自發性或不可控制之出血發作)之一或多種症狀之頻率。然而，「治療」不必為治癒。

[0052] 如本文中所使用之「患者」包括已知發作至少一次不受控制之出血發作、已經診斷有與不受控制之出血發作相關之疾病或病症(例如出血疾病或病症，例如 B 型血友病)、對不受控制之出血發作(例如血友病)敏感或其任何組合之個體。患者亦可包括在某些活動(例如手術、運動活動或任何重體力活動)之前處於一或多種不可控制之出血發作之危險下的個體。該患者可具有小於 1%、小於 0.5%、小於 2%、小於 2.5%、小於 3% 或小於 4% 之基線 FIX 活性。患者亦包括兒科人類。兒科患者已出生 20 年，優選地出生 18 年、出生 16 年、出生 15 年、出生 12 年、出生 11 年、出生 6 年、出生 5 年、出生 2 年及 2 至

11 年。

[0053] 如本文中所使用之「基線」為投與劑量之前個體中之最低量測血漿因子 IX 含量。投藥前可在兩個時間點量測因子 IX 血漿含量：篩選訪問時及緊鄰投藥之前。或者，(a)治療前 FIX 活性 $<1\%$ 、無可偵測之 FIX 抗原且具有無意義基因型之個體中之基線可定義為 0% ；(b)治療前 FIX 活性 $<1\%$ 且具有可偵測之 FIX 抗原之個體之基線可設定在 0.5% ；(c)治療前 FIX 活性介於 1% 與 2% 之間的個體的基線為 C_{min} (整個 PK 研究中之最低活性)；且(d)治療前 FIX 活性 $\geq 2\%$ 之個體之基線可設定在 2% 。投藥前活性高於基線可被視為來自先前治療之殘留藥物，且可能衰減至基線並且自 rFIXFBP 投藥後之 PK 資料中減去。

[0054] 如本文中所使用之「穀」為在投與一個劑量之本發明嵌合多肽或另一因子 IX 分子之後且在投與下一劑量(若存在)之前所達到的最低血漿因子 IX 活性水準。谷在本文中可與「臨限值」互換使用。將基線因子 IX 含量自所量測之因子 IX 含量中減去以計算穀含量。

[0055] 如本文中所使用，術語「半衰期」係指特定多肽在活體內之生物半衰期。半衰期可由投與個體之量之一半自動物之循環及/或其他組織中清除所需之時間表示。

[0056] 術語「長效」及「耐久」在本文中可互換使用。在一個實施例中，術語「長效」或「耐久」指示由於投與 rFIXFBP 多肽所產生之 FIX 活性比野生型 FIX (例如

BENEFIX[®]或血漿衍生之 FIX (「pdFIX」))之 FIX 活性更長久。「更長久」之 FIX 活性可藉由此項技術中之任何已知方法加以量測，例如 aPTT 分析法、顯色分析法、ROTEM、TGA 等。在一個實施例中，「更長久」之 FIX 活性可藉由 $T_{1/2\beta}$ (活性)來顯示。在另一實施例中，「更長久」之 FIX 活性可由血漿中所存在之 FIX 抗原之含量，例如由 $T_{1/2\beta}$ (抗原)來推斷。

[0057] 如本文中所使用之術語「凍乾物」、「凍乾物粉末」、「凍乾物製品」或「製品餅」表示藉由冷凍乾燥法製造之調配物。在真空下昇華且在高溫下解吸殘餘水之後藉由冷凍來移除溶劑(例如水)。在醫藥領域中，凍乾物係以粉末或物理穩定餅之形式存在。凍乾物之特徵在於在添加復原介質之後快速溶解。

[0058] 如本文中所使用之術語「預凍乾調配物」或「凍乾進料」表示藉由冷凍乾燥法移除溶劑(例如水)之前的液體調配物。預凍乾調配物之「填充體積」為液體調配物在凍乾之前的總體積。

[0059] 如本文中所使用之「 $T_{1/2\beta}$ 」或「 βHL 」為與消除相相關之半衰期， $t_{1/2\beta} = (\ln 2) / \text{與末相相關之消除速率常數}$ 。 $T_{1/2\beta}$ 可由 FIX 活性或由血漿中之 FIX 抗原含量來量測。基於活性之 $T_{1/2\beta}$ 顯示為 $T_{1/2\beta}$ (活性)，且基於 FIX 抗原含量之 $T_{1/2\beta}$ 可顯示為 $T_{1/2\beta}$ (抗原)。 $T_{1/2\beta}$ (活性)及 $T_{1/2\beta}$ (抗原)兩者皆可顯示為範圍或幾何平均值。

[0060] 如本文中所使用之術語「復原調配物」或

「復原後組合物」表示經凍乾且藉由添加稀釋劑而再溶解之調配物。稀釋劑可含有而不限於注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化鈉溶液(例如 0.9% (w/v) NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5%葡萄糖)、含界面活性劑之溶液(例如 0.01%聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80)、pH 值緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝溶液)及其組合。

一般凍乾制程

[0061] 凍乾或冷凍乾燥為廣泛用於醫藥工業中用於保存生物學及醫藥材料之制程。凍乾制程亦稱為凍乾循環，其按慣例分為三個不同階段：冷凍、初次乾燥及二次乾燥。如本文中所使用之「凍乾」係指整個凍乾制程，包括冷凍步驟及乾燥步驟兩者。

[0062] 在凍乾中，在冷凍步驟期間將材料中所存在之水轉化成冰且隨後藉由在初次乾燥步驟期間藉由在低壓條件下直接昇華而自材料中移除。然而，在冷凍期間，並非所有水皆轉化成冰。水之某一部分被俘獲在含有例如調配物組分及/或活性成分之固體基質中。基質內之過量結合水可在二次乾燥步驟期間減至所要殘餘水分含量。所有凍乾步驟，即冷凍、初次乾燥及二次乾燥，決定最終製品性質。初次乾燥典型地為凍乾制程中之最長步驟，因此，對此制程部分之優化具有顯著經濟作用。

[0063] 在本發明之某些態樣中，該凍乾制程僅包括初次乾燥步驟。

[0064] 在本發明之某些態樣中，凍乾制程亦包括介於該冷凍步驟與該初次乾燥步驟之間的單獨「真空步驟」。

[0065] 在本發明之其他態樣中，凍乾制程進一步包括介於該冷凍步驟與該初次乾燥步驟之間的「退火步驟」。

[0066] 如本文中所使用之術語「退火步驟」係指進行凍乾之多肽製備之凍乾制程中在該製備之乾燥步驟之前的步驟，其中該製備之溫度自較低溫度上升至較高溫度且隨後在一段時間之後再冷卻。

[0067] 按慣例進行循環及配方優化以確保初次乾燥期間之製品溫度決不超過塌陷溫度。如本文中所使用之術語「塌陷溫度」係指冷凍乾燥期間之製品溫度，高於該溫度時製品餅則開始喪失其原始結構。高於該塌陷溫度時，製品可能經歷緩慢零星鼓泡、膨脹、起泡、空穴化、穿孔、嚴重塌陷、回縮及成珠，從而可能影響製品之外觀。因此，塌陷可能導致不良製品穩定性、長乾燥時間、不均勻乾燥及損失紋理。參見例如 US 2010/0041870。

[0068] 可基於製品品質分析、復原時間、復原品質、高分子量、水分、玻璃轉化溫度(T_g)及生物學或生物化學活性來評估根據本發明之凍乾製品。典型地，製品品質分析包括製品降解速率分析，其係使用包括但不限於以下各項之方法進行：尺寸排除層析法(SEC)、陽離子交換-HPLC (CEX-HPLC)、X 射線繞射(XRD)、調制差示掃描量

熱法(mDSC)、逆相 HPLC (RP-HPLC)、多角度光散射偵測器(MALS)、螢光、紫外線吸收、濁度測定法、毛細管電泳(CE)、SDS-PAGE 及其組合。在一些實施例中，對根據本發明之凍乾製品之評估包括評估餅外觀之步驟。另外，可基於製品典型地在復原之後的生物學或生物化學活性來評估凍乾製品。

凍乾之因子 IX 調配物

[0069] 本揭示案提供包含 FIX 多肽之預凍乾、凍乾及凍乾後調配物或醫藥組合物。

[0070] 在本發明之某些態樣中，本文中所揭示案之調配物包含 FIX 多肽、緩衝劑、穩定劑、增積劑及界面活性劑或其任何組合。調配物亦可含有適用於醫藥調配物之任何其他藥劑。

因子 IX (FIX) 多肽

[0071] 除非另有規定，否則適用於調配物之 FIX 多肽或 FIX 蛋白為正常在凝結方面起作用之功能因子 FIX 蛋白。因而，FIX 多肽包括功能性變異多肽及編碼此種功能性變異多肽之聚核苷酸。在一個實施例中，FIX 多肽為人類、牛、豬、犬、貓及鼠類 FIX 多肽。FIX 之全長多肽及聚核苷酸序列為已知的，同樣已知許多功能變異體，例如片段、突變體及經修飾型式。FIX 多肽包括全長 FIX、全長 FIX 減 N 末端上之 Met、全長 FIX 減信號序列、成熟

FIX (減信號序列及前肽)及 N 末端上具有額外 Met 之成熟 FIX。FIX 可藉由重組手段製造(「重組因子 IX」或「rFIX」), 亦即, 其並非天然存在或來源於血漿。

[0072] 已知許多功能性 FIX 變異體。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 02/040544 A3 號在第 4 頁第 9 至 30 列及第 15 頁第 6 至 31 列揭示對由肝素所致之抑制展現增加之抗性的突變體。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 03/020764 A2 號在表 2 及表 3 中(第 14 至 24 頁)及第 12 頁第 1 至 27 列揭示具有降低之 T 細胞免疫原性的 FIX 突變體。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 2007/149406 A2 號在第 4 頁第 1 列至第 19 頁第 11 列揭示展現增加之蛋白質穩定性、增加之活體內及活體外半衰期及增加之蛋白酶抗性的功能性突變 FIX 分子。WO 2007/149406 A2 在第 19 頁第 12 列至第 20 頁第 9 列亦揭示嵌合及其他變異 FIX 分子。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 08/118507 A2 號在第 5 頁第 14 列至第 6 頁第 5 列揭示展現增加之凝結活性的 FIX 突變體。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 09/051717 A2 號在第 9 頁第 11 列至第 20 頁第 2 列揭示具有增加之 N 連接及/或 O 連接糖基化位點數從而增加半衰期及/或回收率之 FIX 突變體。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 09/137254 A2 號在第 2 頁第[006]段至第 5 頁第[011]段及第 16 頁第[044]段至第 24 頁第[057]段亦揭示具有增加之糖基化位點數的因

子 IX 突變體。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 09/130198 A2 號在第 4 頁第 26 列至第 12 頁第 6 列揭示具有增加之糖基化位點數從而產生增加之半衰期的功能性突變 FIX 分子。以全文引用之方式併入本文中的國際公開案第 WO 09/140015 A2 號在第 11 頁第[0043]段至第 13 頁第[0053]段揭示可用於聚合物(例如 PEG)接合之 Cys 殘基數有所增加之功能性 FIX 突變體。2011 年 7 月 11 日申請且於 2012 年 1 月 12 日公開為 WO 2012/006624 之國際申請案第 PCT/US2011/043569 號中描述 FIX 多肽且亦以全文引用之方式併入本文中。

[0073] 在某些實施例中，該 FIX 多肽包含野生型 FIX。在一些實施例中，該 FIX 多肽進一步包含與野生型 FIX 融合之異源部分。在某些實施例中，該異源部分為延長 FIX 之半衰期的部分。在某些實施例中，該異源部分包含多肽或非多肽部分。

[0074] 在其他實施例中，該 FIX 多肽為長效 FIX 多肽。長效 FIX 多肽可包含 FIX 部分及非 FIX 部分，例如能夠延長該 FIX 多肽之活體內或活體外半衰期的異源部分。例示性非 FIX 部分包括例如 Fc、白蛋白、PAS 序列、轉鐵蛋白、CTP (人絨毛膜促性腺激素(hCG)之 28 胺基酸 C 末端肽(CTP)與其 4 個 O-聚糖)、聚乙二醇(PEG)、羥乙基澱粉(HES)、白蛋白結合多肽、白蛋白結合小分子或其任何組合。本發明之例示性長效 FIX 多肽包括例如因子 IX-Fc 多肽、因子 IX-白蛋白多肽、因子 IX-PAS 多

肽、因子 IX-轉鐵蛋白多肽、因子 IX-CTP 多肽、因子 IX-PEG 多肽、因子 IX-HES 多肽、因子 IX-白蛋白結合多肽多肽或因子 IX-白蛋白結合小分子多肽。

[0075] 在一個實施例中，該 FIX 多肽為 rFIXFc，即由人類凝血因子 IX (FIX)及人類抗體(IgG1 同型)之 Fc 域構成之重組融合蛋白質。參見例如 2011 年 7 月 11 日申請且公開為 WO 2012/006624 之國際申請案第 PCT/US2011/043569 號，該案係以全文引用之方式併入本文中。rFIXFc 多肽為具有 FIXFc 單鏈(FIXFc-sc)及 Fc 單鏈(Fc-sc) (兩者由 Fc 之鉸鏈區中之兩個二硫鍵結合在一起)之異源二聚蛋白。rFIXFc 需要兩個蛋白質亞單位，即 FIXFc-sc (642 個胺基酸，SEQ ID NO:2)及 Fc-sc (227 個胺基酸，SEQ ID NO:4)，以便組裝在經轉染之細胞系內以形成最終蛋白質產物 rFIXFc。編碼 FIXFc-sc 及 Fc-sc 之聚核苷酸序列分別呈現為 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:3。

[0076] 在某些實施例中，rFIXFc 之因子 IX 部分具有與血漿衍生因子 IX 之 Thr148 等位基因形式一致且具有類似於內源因子 IX 之結構及功能特徵的一級胺基酸序列。rFIXFc 之 Fc 域含有 IgG1 之鉸鏈區、CH2 區及 CH3 區。所組裝之 rFIXFc 之異源二聚體成熟形式含有 869 個分子量大致為 98 千道爾頓之胺基酸。在一些實施例中，該 rFIXFc 多肽包含與 SEQ ID NO:2 之胺基酸 1 至 642 具有至少 90%、95%或 100%一致性的胺基酸序列。

[0077] 在一個實施例中，與 FIX 融合之第二部分為

FcRn 結合搭配物。在另一實施例中，與 FIX 融合之 FcRn 結合搭配物為 Fc 片段。FcRn 結合搭配物為可由 FcRn 受體特異性結合隨後由 FcRn 結合搭配物之 FcRn 受體活性轉運的任何分子。因而，術語 Fc 包括功能性 IgG Fc 之任何變異體。已基於 X 射線晶體學描述 IgG 之 Fc 部分中結合 FcRn 受體之區域 (Burmeister 等人, *Nature* 372:379 (1994), 以全文引用之方式併入本文中)。Fc 與 FcRn 之主要接觸區域在 CH2 域與 CH3 域接合處附近。Fc-FcRn 觸點均在單一 Ig 重鏈內。FcRn 結合搭配物包括例如整個 IgG、IgG 之 Fc 片段及 IgG 中包括 FcRn 之完整結合區的其他片段。主要接觸位點包括 CH2 域之胺基酸殘基 248、250-257、272、285、288、290-291、308-311 及 314 以及 CH3 域之胺基酸殘基 385-387、428 及 433-436。對免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或區域之胺基酸編號之參考均基於 Kabat 等人, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, 該文獻係以全文引用之方式併入本文中。已自若干哺乳動物物種(包括人類)分離 FcRn 受體。人類 FcRn、大鼠 FcRn 及小鼠 FcRn 之序列為已知的 (Story 等人, *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994), 該文獻係以全文引用之方式併入本文中。)Fc 可包含免疫球蛋白之 CH2 域及 CH3 域而存在或不存在免疫球蛋白之鉸鏈區。WO 2004/101740 及 WO 2006/074199 中提供例示性 Fc 變異體，該兩文獻以全文引用之方式併入本文中。

[0078] Fc (或嵌合多肽之 Fc 部分)可含有一或多個突變及突變之組合。

[0079] Fc (或嵌合多肽之 Fc 部分)可含有能賦予增加之半衰期的突變，諸如 M252Y、S254T、T256E 及其組合，如 Oganessian 等人，*Mol. Immunol.* 46:1750 (2009)中所揭示，該文獻係以全文引用之方式併入本文中；H433K、N434F 及其組合，如 Vaccaro 等人，*Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005)中所揭示，該文獻係以全文引用之方式併入本文中；US 2009/0264627 A1 之第 1 至 2 頁第[0012]段以及實例 9 及實例 10 中所揭示之突變體，該文獻係以全文引用之方式併入本文中；及 US 20090163699 A1 之第 2 頁第[0014]至[0021]段中所揭示之突變體，該文獻係以全文引用之方式併入本文中。

[0080] Fc (或嵌合多肽之 Fc 部分)亦可包括例如以下突變：IgG 之 Fc 區可根據諸如定點突變誘發等公認程式加以修飾，以產生經修飾之 IgG 或 Fc 片段或其中將由 FcRn 結合之部分。此種修飾包括例如遠離 FcRn 接觸位點之修飾以及處於接觸位點內保留或甚至增強與 FcRn 結合之修飾。舉例而言，人類 IgG1 Fc (Fcγ1)中之以下單一胺基酸殘基可經取代而不顯著損失對 FcRn 之 Fc 結合親和力：P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、

K290A 、 R292A 、 E293A 、 E294A 、 Q295A 、 Y296F 、 N297A 、 S298A 、 Y300F 、 R301A 、 V303A 、 V305A 、 T307A 、 L309A 、 Q311A 、 D312A 、 N315A 、 K317A 、 E318A 、 K320A 、 K322A 、 S324A 、 K326A 、 A327Q 、 P329A 、 A330Q 、 A330S 、 P331A 、 P331S 、 E333A 、 K334A 、 T335A 、 S337A 、 K338A 、 K340A 、 Q342A 、 R344A 、 E345A 、 Q347A 、 R355A 、 E356A 、 M358A 、 T359A 、 K360A 、 N361A 、 Q362A 、 Y373A 、 S375A 、 D376A 、 A378Q 、 E380A 、 E382A 、 S383A 、 N384A 、 Q386A 、 E388A 、 N389A 、 N390A 、 Y391F 、 K392A 、 L398A 、 S400A 、 D401A 、 D413A 、 K414A 、 R416A 、 Q418A 、 Q419A 、 N421A 、 V422A 、 S424A 、 E430A 、 N434A 、 T437A 、 Q438A 、 K439A 、 S440A 、 S444A 及 K447A，其中舉例而言，P238A 表示在位置編號 238 上以丙胺酸取代野生型脯胺酸。除丙胺酸以外，其他胺基酸可取代以上所說明之位置上的野生型胺基酸。可以單一地向 Fc 中引入突變，從而產生多於一百個不同於天然 Fc 之 FcRn 結合搭配物。另外，此等個別突變中之兩者、三者或更多者之組合可一起引入，從而產生數以百計之 FcRn 結合搭配物。此等突變中某些可賦予 FcRn 結合搭配物新功能。舉例而言，一個實施例併入 N297A，從而移除高度保守之 N 糖基化位點。此突變之作用在於降低免疫原性，從而增加 FcRn 結合搭配物之循環半衰期；及致使 FcRn 結合搭配物不能夠結合 FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB 及

FcγRIIIA，而不損害對 FcRn 之親和力(Routledge 等人, 1995, *Transplantation* 60:847，其係以全文引用之方式併入本文中；Friend 等人, 1999, *Transplantation* 68:1632，其係以全文引用之方式併入本文中；Shields 等人, 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591，其係以全文引用之方式併入本文中；)。另外，至少三種人類 Fcγ 受體看似可識別下鉸鏈區內之 IgG 上之結合位點(一般為胺基酸 234-237)。因此，新功能及可能之降低之免疫原性之另一實例可歸因於此區域之突變，舉例而言，如藉由人類 IgG1 之胺基酸 233-236 「ELLG」置換為來自於 IgG2 之相應序列「PVA」(具有一個胺基酸缺失)。已顯示，當已引入此種突變時，介導各種效應功能之 FcγRI、FcγRII 及 FcγRIII 將不結合 IgG1 (Ward 及 Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77 (1995)，其係以全文引用之方式併入本文中；及 Armour 等人, *Eur. J. Immunol.* 29:2613 (1999)，其係以全文引用之方式併入本文中)。作為由上述突變產生之新功能之另一實例，在一些情況下，FcRn 親和力可有所增加，超過野生型。此增加之親和力可體現增加之「締合」速率、降低之「解離」速率或增加之「締合」速率與降低之「解離」速率兩者。據信可賦予增加之 FcRn 親和力的突變包括例如 T256A、T307A、E380A 及 N434A (Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 276:6591 (2001)，該文獻係以全文引用之方式併入本文中)。

[0081] Fc (或嵌合多肽之 Fc 部分)可與表 14 中所示之

Fc 胺基酸序列(例如 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 21 至 247)具有至少約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或約 100%一致性。Fc (或嵌合多肽之 Fc 部分)可與表 14 中所示之 Fc 胺基酸序列(例如 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 21 至 247)一致。

[0082] 如上文所論述，例示性長效多肽亦包括與一或多個白蛋白多肽、白蛋白結合多肽或白蛋白結合小分子融合之 FIX。在一個實施例中，該白蛋白為人類白蛋白。白蛋白或白蛋白結合蛋白可融合於 FIX 之 N 末端或 FIX 之 C 末端或插入 FIX 中之兩個胺基酸之間。可用於本發明之白蛋白(例如其片段)之實例為已知的，例如美國專利第 7,592,010 號；美國專利第 6,686,179 號；及 Schulte, *Thrombosis Res.* 124 增刊 2:S6-S8 (2009)，該等文獻各自係以全文引用之方式併入本文中。

[0083] 白蛋白結合多肽可包括而不限於可結合白蛋白之細菌白蛋白結合域、白蛋白結合肽或白蛋白結合抗體片段。由 Kraulis 等人, *FEBS Lett.* 378:190-194 (1996)及 Linhult 等人, *Protein Sci.* 11:206-213 (2002)所揭示之來自鏈球菌蛋白 G 之結構域 3 為細菌白蛋白結合域之一個實例。白蛋白結合肽之實例包括具有核心序列 DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 5)之一系列肽。參見例如 Dennis 等人, *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 35035-35043 (2002)。白蛋白結合抗體片段之實例揭示於以下文獻中：Muller 及 Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:319-326

(2007)；Rooverset 等人，*Cancer Immunol. Immunother.* 56:303-317 (2007)；及 Holt 等人，*Prot. Eng. Design Sci.*, 21:283-288 (2008)，該等文獻係以全文引用之方式併入本文中。

[0084] 在某些態樣中，本發明之重組 FIX 多肽包含至少一個針對可結合白蛋白之非多肽小分子、其變異體或衍生物的連接位點。此種白蛋白結合部分之一個實例為如 Trusselet 等人，*Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009)所揭示之 2-(3-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)-6-(4-(4-碘苯基)丁醯胺基)己酸酯(「Albu」標籤)。

[0085] 如上文所論述，例示性長效多肽亦包括與人絨毛膜促性腺激素之 β 亞單位之至少一個 C 末端肽(CTP)或其片段、變異體或衍生物融合之 FIX。CTP 可融合於 FIX，於 FIX 之 N 末端或於 FIX 之 C 末端。已知融合或插入重組蛋白質之一或多種 CTP 肽可增加該蛋白質之活體內半衰期。參見例如美國專利第 5,712,122 號，該專利係以全文引用之方式併入。例示性 CTP 肽包括 DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO : 6)或 SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 7)。參見例如美國專利申請公開案第 US 2009/0087411 A1 號，該案係以引用之方式併入。

[0086] 如上文所論述，例示性長效多肽亦包括與至少一個 PAS 序列或其片段、變異體或衍生物融合之 FIX。PAS 序列可融合於 FIX 之 N 末端或 FIX 之 C 末端。如本

文中所使用之 PAS 肽或 PAS 序列意謂主要包含丙胺酸及絲胺酸殘基或主要包含丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸殘基之胺基酸序列，該胺基酸序列在生理條件下形成隨機螺圈構形。因此，PAS 序列為包含丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸、基本上由丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸組成或由丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸組成之構築塊、胺基酸聚合物或序列卡匣，其可用作嵌合蛋白質中之異源部分之一部分。當添加除丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸以外之殘基作為 PAS 序列中之次要組分時，胺基酸聚合物亦可形成隨機螺圈構形。「次要組分」意謂除丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸以外之胺基酸可添加於 PAS 序列中達到一定程度，例如至多約 12%（亦即，PAS 序列之 100 個胺基酸中之約 12 個）、至多約 10%、至多約 9%、至多約 8%、約 6%、約 5%、約 4%、約 3%、約 2%或約 1%之胺基酸。不同於丙胺酸、絲胺酸及脯胺酸之胺基酸可選自由以下組成之群：Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr 及 Val。在生理條件下，PAS 肽形成隨機螺圈構形且從而可介導本發明之重組蛋白質之活體內及/或活體外穩定性增加，且具有促凝血活性。

[0087] PAS 肽之非限制性實例包括 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 8)、AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 9)、APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 10)、APSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 11)、

SSPSAPSPSSPASPSPPA (SEQ ID NO : 12)、
 AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO : 13)、
 ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO : 14)或其任何
 變異體、衍生物、片段或組合。PAS 序列之其他實例可由
 例如美國專利公開案第 2010/0292130 A1 號、PCT 申請公
 開案第 WO 2008/155134 A1 號及歐洲已頒予專利
 EP2173890 獲知。

[0088] 如上文所論述，例示性長效多肽亦包括與至
 少一個轉鐵蛋白肽或其片段、變異體或衍生物融合之 FIX
 。至少一個轉鐵蛋白肽可融合於 FIX 之 N 末端或 FIX 之
 C 末端或插入 FIX 中之兩個胺基酸之間。任何轉鐵蛋白均
 可融合於或插入本發明之重組 FIX 蛋白中。作為一個實例
 ，野生型人類 Tf (Tf)為大約 75 KDa (不考慮糖基化)、具
 有兩個主要結構域 N (約 330 個胺基酸)及 C (約 340 個胺
 基酸)之 679 個胺基酸蛋白質，其看似來源於基因複製。
 參見 GenBank 登錄號 NM001063、XM002793、M12530、
 XM039845、XM 039847 及 S95936 (www.ncbi.nlm.nih.
 gov)，該等登錄號均以全文引用之方式併入本文中。

[0089] 轉鐵蛋白藉由轉鐵蛋白受體(TfR)介導之胞吞
 作用來轉運鐵。在鐵釋放至內涵體隔室中且 Tf-TfR 複合
 物再循環至細胞表面之後，Tf 釋放回細胞外空間以用於
 下一鐵轉運循環。Tf 具有超過 14 至 17 天之長半衰期(Li
 等人, *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002))。已研究
 轉鐵蛋白融合蛋白之半衰期延長、癌症療法之靶向遞送、

胰島素原之經口遞送及持續活化 (Brandsma 等人, *Biotechnol. Adv.*, 29: 230-238 (2011); Bai 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292-7296 (2005); Kim 等人, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682-692 (2010); Wang 等人, *J. Controlled Release* 155:386-392 (2011))。

[0090] 如上文所論述，例示性長效多肽亦包括與至少一個聚乙二醇(PEG)部分融合之 FIX。

[0091] PEG 化 FIX 可能係指 FIX 與至少一個聚乙二醇(PEG)分子之間形成的結合物。PEG 可以多種分子量及平均分子量範圍購自市面。PEG 平均分子量範圍之典型實例包括但不限於約 200、約 300、約 400、約 600、約 1000、約 1300-1600、約 1450、約 2000、約 3000、約 3000-3750、約 3350、約 3000-7000、約 3500-4500、約 5000-7000、約 7000-9000、約 8000、約 10000、約 8500-11500、約 16000-24000、約 35000、約 40000、約 60000 及約 80000 道爾頓。此等平均分子量僅作為實例提供且決非意在具有限制性。

[0092] 本發明之重組長效 FIX 蛋白可經 PEG 化以包括單或多(例如 2 至 4 個) PEG 部分。PEG 化可藉由此項技術中已知的任何 PEG 化反應來進行。用於製備 PEG 化蛋白質產物之方法一般將包括(i)使多肽與聚乙二醇(諸如 PEG 之反應性酯或醛衍生物)在使得本發明之肽連接於一或多個 PEG 基團之條件下反應；及(ii)獲得反應產物。一般而言，反應之最佳反應條件將基於已知參數及所要結果

根據情況確定。

[0093] 熟習此項技術者可利用許多 PEG 連接法，例如 Malik F 等人，*Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992)；Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992)；歐洲專利公開案第 EP0401384 號、第 EP0154316 號及第 EP0401384 號；及國際專利申請公開案第 WO92/16221 號及第 WO95/34326 號。作為一個非限制性實例，FIX 變異體可在 FIX 中之一或多個插入位點上含有半胱胺酸取代，且半胱胺酸可進一步結合於 PEG 聚合物。參見 Mei 等人，*Blood* 116:270-279 (2010)及美國專利第 7,632,921 號，該等文獻係以全文引用之方式併入本文中。

[0094] 如上文所論述，例示性長效多肽亦包括與至少一個羥乙基澱粉(HES)聚合物融合之 FIX。HES 為天然存在之支鏈澱粉之衍生物且在體內由 α -澱粉酶降解。HES 展現有利生物學性質且用作血液容量置換劑並且在臨床上用於血液稀釋療法。參見例如 Sommermeyer 等人，*Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987)；及 Weidler 等人，*Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991)。

[0095] HES 主要以分子量分佈及取代度為特徵。HES 所具有之平均分子量(重量平均值)為 1 至 300 kD、2 至 200 kD、3 至 100 kD 或 4 至 70 kD。就羥乙基而言，羥乙基澱粉可進一步展現 0.1 至 3、0.1 至 2、0.1 至 0.9 或 0.1 至 0.8 之莫耳取代度及在 2 至 20 範圍內之 C2:C6 取代比。平均分子量為約 130 kD 之 HES 為得自 Fresenius 之

VOLUVEN®。VOLUVEN®為用於例如治療適應症中所使用之體積置換以便治療及預防低血容量症的人工膠體。熟習此項技術者可利用許多 HES 連接方法，例如與上文所述相同之 PEG 連接法。

[0096] 因子 IX 凝結活性係以國際單位(IU)表示。一個 IU 之因子 IX 活性大致對應於一毫升正常人血漿中之因子 IX 之量。若干分析法可用於量測因子 IX 活性，包括一步凝結分析法(活化部分凝血酶時間；aPTT)、凝血酶世代時間(TGA)及旋轉式血栓彈性分析術(ROTEM®)。

緩衝劑

[0097] 適用於本發明之緩衝劑可為用於在添加另一酸或鹼之後維持溶液之酸性(pH 值)接近所選值的弱酸或鹼。合適之緩衝劑可藉由維持調配物之 pH 值控制而使醫藥調配物之穩定性最大化。合適之緩衝劑亦可確保生理相容性或優化溶解性。流變學性質、黏度及其他性質亦可視調配物之 pH 值而定。常用緩衝劑包括但不限於組胺酸、檸檬酸鹽、琥珀酸鹽、乙酸鹽及磷酸鹽。在一些實施例中，緩衝劑包含 L-組胺酸或 L-組胺酸與 L-組胺酸鹽酸鹽與等滲劑之混合物，且可能用此項技術中已知的酸或鹼進行 pH 值調節。在某些實施例中，該緩衝劑為 L-組胺酸。在某些實施例中，該調配物之 pH 值係維持在約 6 與約 8 之間或約 6.5 與約 7.5 之間。

穩定劑

[0098] 將穩定劑添加至醫藥製品中以便穩定該製品。此種藥劑可以許多不同的方式穩定蛋白質。常用穩定劑包括但不限於諸如甘胺酸、丙胺酸、離胺酸、精胺酸或蘇胺酸之胺基酸、諸如葡萄糖、蔗糖、海藻糖、棉籽糖或麥芽糖之糖、諸如甘油、甘露醇、山梨醇、環糊精或任何種類及分子量之聚葡萄糖或 PEG 之多元醇。在本發明之一個態樣中，選擇穩定劑以便使凍乾製劑中之 FIX 多肽之穩定性最大化。在某些實施例中，穩定劑為蔗糖。

增積劑

[0099] 可將增積劑添加至藥物製品中以便增加製品之體積及品質，從而有助於對其進行精確計量及處理。常用增積劑包括但不限於乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、碳酸鈣或硬脂酸鎂。在某些實施例中，增積劑為甘露醇。

界面活性劑

[0100] 界面活性劑為具有親水性基團及疏水性基團之兩性物質。界面活性劑可為陰離子、陽離子、兩性離子或非離子的。非離子界面活性劑之實例包括但不限於乙氧基化烷基、乙氧基化壬基苯酚、乙氧基化胺、聚氧化乙烯、聚氧化丙烯、諸如鯨蠟醇或油醇之脂肪醇、椰油醯胺 MEA、椰油醯胺 DEA、聚山梨醇酯或十二烷基二甲胺氧

化物。在某些實施例中，該界面活性劑為聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80。

預凍乾調配物

[0101] 在一個態樣中，本揭示案提供一種預凍乾調配物，其包含：

- (a) 因子 IX (FIX)多肽，其具有 FIX 凝結活性；
- (b) 緩衝劑；
- (c) 穩定劑；
- (d) 增積劑；及
- (e) 界面活性劑，

其中該調配物所具有之填充體積小於約 5 mL、小於約 4 mL 或小於約 3 mL，且其中(a)至(e)中每一者之每小瓶之量(mg/小瓶)足以允許

與參考預凍乾調配物相比，

- (1) 當凍乾時改良該 FIX 多肽之穩定性；
- (2) 當凍乾時減少復原時間；
- (3) 減少潑灑至包含該調配物之封塞上；
- (4) 減少凍乾循環時間；

(5) 增加由該預凍乾調配物製備之凍乾物在室溫下之儲存期限；或

- (6) 其任何組合，

且其中該參考調配物所包含之(a)至(e)之每小瓶之量與該預凍乾調配物相同，但具有至少 5 mL 填充體積。在

一些實施例中，該參考調配物具有 5.3 mL 填充體積或 5 mL 填充體積。

[0102] 在其他實施例中，該預凍乾調配物允許選自以下之至少兩種、至少三種、至少四種或至少五種性質：(1)當凍乾時改良該 FIX 多肽之穩定性；(2)當凍乾時減少復原時間；(3)減少潑灑至包含該調配物之封塞上；(4)減少凍乾循環時間；及 (5)增加由該預凍乾調配物製備之凍乾物在室溫下之儲存期限。在某些實施例中，該預凍乾調配物允許(1)當凍乾時改良該 FIX 多肽之穩定性。在某些實施例中，該預凍乾調配物允許(2)當凍乾時減少復原時間。在某些實施例中，該預凍乾調配物允許(3)減少潑灑至包含該調配物之封塞上。在某些實施例中，該預凍乾調配物允許(4)減少凍乾循環時間。在某些實施例中，該預凍乾調配物允許(5)增加由該預凍乾調配物製備之凍乾物在室溫下之儲存期限。在某些實施例中，該預凍乾調配物允許(6)本文中所描述之性質的任何組合。

[0103] 在某些實施例中，該預凍乾調配物包含至少約 100 IU/小瓶之 FIX 多肽。在某些實施例中，該預凍乾調配物包含至少約 200 IU/小瓶至約 10,000 IU/小瓶之 FIX 多肽、約 200 IU/小瓶至約 6,000 IU/小瓶或約 500 IU/小瓶至約 5,000 IU/小瓶。在某些實施例中，該預凍乾調配物包含約 220 IU/小瓶、約 250 IU/小瓶、約 300 IU/小瓶、約 400 IU/小瓶、約 500 IU/小瓶、約 600 IU/小瓶、約 700 IU/小瓶、約 800 IU/小瓶、約 900 IU/小瓶、約 1,000 IU/

小瓶、約 1,100 IU/小瓶、約 1,200 IU/小瓶、約 1,300 IU/小瓶、約 1,400 IU/小瓶、約 1,500 IU/小瓶、約 2,000 IU/小瓶、約 2,500 IU/小瓶、約 3,000 IU/小瓶、約 4,000 IU/小瓶、約 5,000 IU/小瓶、約 5,500 IU/小瓶、約 6,000 IU/小瓶、約 6,500 IU/小瓶、約 7,000 IU/小瓶、約 7,500 IU/小瓶、約 8,000 IU/小瓶、約 8,500 IU/小瓶、約 9,000 IU/小瓶、約 9,500 IU/小瓶或約 10,000 IU/小瓶之該 FIX 多肽。

[0104] 在一些實施例中，藉由減少填充體積來達成該預凍乾調配物之更高濃度。在某些實施例中，該預凍乾調配物所具有之填充體積為約 4.0 mL、約 3.5 mL、約 3.0 mL、約 2.9 mL、約 2.8 mL、約 2.7 mL、約 2.65 mL、約 2.6 mL、約 2.5 mL、約 2.4 mL、約 2.3 mL、約 2.2 mL、約 2.1 mL 或約 2.0 mL。在一些實施例中，該預凍乾調配物之填充體積為約 2.65 mL。在一些實施例中，該預凍乾調配物之填充體積小於約 5 mL。

[0105] 在一些實施例中，藉由額外純化步驟，例如第二超濾步驟來進一步濃縮該 FIX 多肽。

[0106] 在某些實施例中，該減少之復原時間少於 1.5 分鐘、少於 1 分鐘、少於 50 秒、少於 40 秒、少於 30 秒、少於 20 秒或少於 10 秒。在特定實施例中，該減少之復原時間少於 30 秒。

[0107] 在某些實施例中，該預凍乾調配物之減少之凍乾循環時間為約 4 天或更少、約 3 天或更少、約 2 天或

更少或者約 1 天或更少。

[0108] 在某些實施例中，該預凍乾調配物中之緩衝劑之濃度介於約 3 mg/mL 與約 15 mg/mL 之間、介於 4 mg/mL 與 12 mg/mL 之間、介於約 5 mg/mL 與約 10 mg/mL 之間或介於約 5.82 mg/mL 與約 9.7 mg/mL 之間。在一個實施例中，該緩衝劑之濃度介於約 3.88 mg/mL 與約 9.7 mg/mL 之間。在一個實施例中，該緩衝劑之濃度為約 7.76 mg/mL。在一些實施例中，該預凍乾調配物所含有之 L-組胺酸之濃度為約 7.76 mg/mL。

[0109] 在某些實施例中，該預凍乾調配物中之穩定劑之濃度介於 10 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間、介於約 13 mg/mL 與約 40 mg/mL 之間、介於約 15 mg/mL 與約 35 mg/mL 之間或介於約 17.85 mg/mL 與約 29.95 mg/mL 之間。在一個實施例中，該緩衝劑之濃度為約 23.8 mg/mL。在一些實施例中，該預凍乾調配物所含有之蔗糖之濃度為 23.8 mg/mL。

[0110] 在某些實施例中，該預凍乾調配物中之增積劑之濃度介於約 20 mg/mL 與約 100 mg/mL 之間、介於約 30 mg/mL 與約 70 mg/mL 之間、介於約 30 mg/mL 與約 60 mg/mL 之間或介於約 35.7 mg/mL 與約 59.5 mg/mL 之間。在一個實施例中，該增積劑之濃度為約 47.6 mg/mL。在一些實施例中，該預凍乾調配物所含有之甘露醇之濃度為約 47.6 mg/mL。

[0111] 在某些實施例中，該預凍乾調配物中之界面

活性劑之濃度介於約 0.01 mg/mL 與約 5 mg/mL 之間、介於約 0.1 mg/mL 與約 4 mg/mL 之間、介於約 0.1 mg/mL 與約 3 mg/mL 之間、介於約 0.01 mg/mL 與約 2 mg/mL 之間或介於約 0.05 mg/mL 與約 1 mg/mL 之間。在一個實施例中，該界面活性劑之濃度為約 0.2 mg/mL。在一些實施例中，該預凍乾調配物所含有之聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80 之濃度為約 0.2 mg/mL。

[0112] 在某些實施例中，該預凍乾調配物中之 FIX 多肽之濃度介於約 80 IU/mL 與約 2,750 IU/mL 之間。在一些實施例中，該預凍乾調配物中之 FIX 多肽之濃度為至少約 100 IU/mL、至少約 200 IU/mL、至少約 300 IU/mL、至少約 400 IU/mL、至少約 500 IU/mL、至少約 600 IU/mL、至少約 700 IU/mL、至少約 800 IU/mL、至少約 900 IU/mL、至少約 1000 IU/mL、至少約 1500 IU/mL、至少約 2000 IU/mL 或至少約 2500 IU/mL。

[0113] 在一個態樣中，本揭示案進一步提供一種預凍乾調配物，其包含：

- (a) 約 80 至約 2,750 IU/mL 之 rFIXFc；
- (b) 約 7.76 mg/mL 之 L-組胺酸。
- (c) 約 47.6 mg/mL 之甘露醇；
- (d) 約 23.8 mg/mL 之蔗糖；及，
- (e) 約 0.2 mg/mL 之聚山梨醇酯-20。

[0114] 在某些實施例中，此種預凍乾調配物之填充體積為約 3 mL、約 2.9 mL、約 2.8 mL、約 2.7 mL、約

2.65 mL、約 2.6 mL、約 2.5 mL、約 2.4 mL、約 2.3 mL、約 2.2 mL、約 2.1 mL 或約 2.0 mL。在一個實施例中，此種預凍乾調配物之填充體積為約 2.65 mL。

[0115] 另外，本揭示案提供一種凍乾物粉末，其係由上述預凍乾調配物中之任一種凍乾。在一些實施例中，該預凍乾調配物為本文中所描述之任何調配物。

凍乾物粉末

[0116] 本揭示案亦提供一種包含 FIX 多肽、緩衝劑、穩定劑、增積劑、界面活性劑或其任何組合之凍乾物粉末。

[0117] 在某些實施例中，該凍乾物粉末包含介於每小瓶約 8 mg 與約 39 mg 之間、介於每小瓶約 9 mg 與約 35 mg 之間、介於每小瓶 10 mg 與約 30 mg 之間、介於每小瓶約 12 mg 與約 25 mg 之間、介於每小瓶約 15 mg 與約 23 mg 之間的緩衝劑(例如 L-組胺酸)。在一個實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 25 mg、每小瓶約 24 mg、每小瓶約 23 mg、每小瓶約 22 mg、每小瓶約 21 mg、每小瓶約 20 mg、每小瓶約 19 mg、每小瓶約 18 mg、每小瓶約 17 mg、每小瓶約 16 mg、每小瓶約 15 mg 之緩衝劑。在另一實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 20.6 mg 之緩衝劑。在一些實施例中，該緩衝劑為 L-組胺酸。

[0118] 在某些實施例中，該凍乾物粉末包含介於每小瓶約 27 mg 與約 132 mg 之間、介於每小瓶約 30 mg 與

約 120 mg 之間、介於每小瓶約 40 mg 與約 110 mg 之間、介於每小瓶約 50 mg 與約 100 mg 之間、介於每小瓶約 60 mg 與約 90 mg 之間的穩定劑。在一個實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 68 mg、每小瓶約 67 mg、每小瓶約 66 mg、每小瓶約 65 mg、每小瓶約 64 mg、每小瓶約 63 mg、每小瓶約 62 mg、每小瓶約 61 mg、每小瓶約 60 mg、每小瓶約 59 mg 之穩定劑。在另一實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 63.1 mg 之穩定劑。在一些實施例中，該穩定劑為蔗糖。

[0119] 在某些實施例中，該凍乾物粉末包含介於每小瓶約 50 mg 與約 265 mg 之間、介於每小瓶約 53 mg 與約 265 mg 之間、介於每小瓶約 50 mg 與約 250 mg 之間、介於每小瓶約 53 mg 與約 265 mg 之間、介於每小瓶約 80 mg 與約 200 mg 之間、介於每小瓶約 100 mg 與約 150 mg 之間或介於每小瓶約 110 mg 與約 140 mg 之間的增積劑。在一個實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 131 mg、每小瓶約 130 mg、每小瓶約 129 mg、每小瓶約 128 mg、每小瓶約 127 mg、每小瓶約 126 mg、每小瓶約 125 mg、每小瓶約 124 mg、每小瓶約 123 mg 或每小瓶約 122 mg 之增積劑。在另一實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 126.1 mg 之增積劑。在一些實施例中，該增積劑為甘露醇。

[0120] 在某些實施例中，該凍乾物粉末包含介於每小瓶約 0.03 mg 與約 13 mg 之間、介於每小瓶約 0.05 mg

與約 10 mg 之間、介於每小瓶約 0.07 mg 與約 8 mg 之間、介於每小瓶約 0.1 mg 與約 2 mg 之間的界面活性劑。在一個實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 1 mg、每小瓶約 0.9 mg、每小瓶約 0.8 mg、每小瓶約 0.7 mg、每小瓶約 0.6 mg、每小瓶約 0.5 mg、每小瓶約 0.4 mg、每小瓶約 0.3 mg、每小瓶約 0.2 mg 或每小瓶約 0.1 mg 之界面活性劑。在另一實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 0.5 mg 之界面活性劑。在一個實施例中，該凍乾物粉末包含每小瓶約 0.53 mg 之界面活性劑。在一些實施例中，該界面活性劑為聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80。

[0121] 在某些實施例中，該凍乾物粉末包含：

- (a) FIX 多肽，其量介於每小瓶約 2 mg 與每小瓶約 150 mg 之間；
- (b) 緩衝劑，其量介於每小瓶約 10 mg 與每小瓶約 30 mg 之間；
- (c) 增積劑，其量介於每小瓶約 70 mg 與每小瓶約 200 mg 之間；
- (d) 穩定劑，其量介於每小瓶約 30 mg 與每小瓶 100 mg 之間；及
- (e) 界面活性劑，其量介於每小瓶約 0.05 mg 與每小瓶約 5 mg 之間。

[0122] 在一些實施例中，該凍乾物粉末包含：

- (a) FIX 多肽，其量介於每小瓶約 2.2 mg 與每小瓶約 125 mg 之間；

(b) 緩衝劑，其量介於每小瓶約 8 mg 與每小瓶約 39 mg 之間；

(c) 增積劑，其量介於每小瓶約 53 mg 與每小瓶約 265 mg 之間。

(d) 穩定劑，其量介於每小瓶約 27 mg 與每小瓶 132 mg 之間；及

(e) 界面活性劑，其量介於每小瓶約 0.03 mg 與每小瓶約 13 mg 之間。

[0123] 在某些實施例中，該凍乾物粉末包含：

(a) 該凍乾之 FIX 多肽，其量介於每小瓶約 2.2 mg 與每小瓶約 125 mg 之間；

(b) 該緩衝劑，其量介於每小瓶約 12.5 mg 與每小瓶 25 mg 之間；

(c) 該穩定劑，其量介於每小瓶約 32.5 mg 與每小瓶 80 mg 之間；

(d) 該增積劑，其量介於每小瓶約 75 mg 與每小瓶 150 mg 之間；及

(e) 該界面活性劑，其量介於約 0.1 mg/mL 與約 2 mg/mL 之間。

[0124] 在一個實施例中，該凍乾物粉末包含：

(a) 約 2.2 至約 125 mg/小瓶之該 FIX 多肽；

(b) 約 20.6 mg/小瓶之 L-組胺酸；

(c) 約 126.1 mg/小瓶之甘露醇；

(d) 約 63.1 mg/小瓶之蔗糖；及

(e) 約 0.53 mg/小瓶之聚山梨醇酯 20。

復原調配物

[0125] 此外，本揭示案提供一種復原調配物，其包含由復原緩衝液復原之上述凍乾物粉末中之任一種。

[0126] 在某些實施例，該復原緩衝液為 NaCl 溶液。在一些實施例中，該復原緩衝液為 5 mL。

[0127] 在某些實施例中，該復原調配物包含：

(a) 該 FIX 多肽，其濃度介於約 0.9 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間；

(b) 該緩衝劑，其濃度介於 2 mg/mL 與約 5 mg/mL 之間；

(c) 該增積劑，其濃度介於 20 mg/mL 與約 30 mg/mL 之間；

(d) 該穩定劑，其濃度介於每小瓶 8 mg/mL 與 15 mg/mL 之間；及

(e) 該界面活性劑，其濃度介於 0.05 mg/mL 與約 0.4 mg/mL 之間。

[0128] 在某些實施例中，該復原調配物包含：

(a) 該 FIX 多肽，其濃度介於約 0.9 mg/mL 與約 50 mg/mL 之間；

(b) 該緩衝劑，其濃度為約 3.88 mg/mL；

(c) 該增積劑，其濃度為約 23.8 mg/mL；

(d) 該穩定劑，其濃度為約 11.9 mg/mL；

- (e) 該界面活性劑，其濃度為約 0.1 mg/mL；及
- (f) 該復原緩衝液，其包含約 3.25 mg/mL NaCl。

[0129] 在某些實施例中，該復原調配物包含：

(a) 該 FIX 多肽，其濃度介於約 80 IU/mL 與約 2,750 IU/mL 之間；

(b) 該緩衝劑，其濃度為約 25 mM；

(c) 該增積劑，其濃度為約 131 mM；

(d) 該穩定劑，其濃度為約 35 mM；

(e) 該界面活性劑，其濃度為 0.01% (w/v)；及

(f) 該復原緩衝液。

[0130] 調配物組合物之實例進一步提供於表 2 至表 4 中。

[0131] 在一個態樣中，本揭示案進一步提供一種小瓶，其包含本文中所描述之預凍乾調配物、凍乾物粉末或復原調配物。

[0132] 在另一個態樣中，本揭示案提供一種套組，其包括包含本文中所描述之凍乾物粉末的第一容器及包含復原緩衝液之第二容器，當與該第一容器之凍乾物粉末組合時，該復原緩衝液之體積足以產生復原調配物。在某些實施例中，該套組中之復原緩衝液之體積為約 5 mL。在一些實施例中，該體積為約 5.3 mL。在某些實施例中，該套組之復原緩衝液包含 NaCl。在一些實施例中，該套組係用於治療 B 型血友病。

[0133] 在另一態樣中，本揭示案提供一種向有需要

之 B 型血友病患者投與 FIX 多肽之方法，其包括向該患者投與本文中所描述之復原調配物，其中該投與預防或降低該患者之出血發作之頻率或嚴重程度。

[0134] 本揭示案進一步提供一種藉由投與本文中所描述之復原調配物來預防、治療、改善或控制有需要之患者之 B 型血友病的方法。

生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末的方法

[0135] 本揭示案提供生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末的方法。在一個態樣中，本揭示案提供凍乾方法，其包括將本文中所描述之預凍乾調配物凍乾。在另一態樣中，本揭示案提供一種凍乾方法，其包括單一乾燥步驟。

[0136] 在一個態樣中，本揭示案提供一種凍乾 FIX 多肽之方法，其包括：

(a) 「冷凍步驟」，其包括將包含該 FIX 多肽及水性溶劑之預凍乾調配物冷凍；

(b) 「真空步驟」，其包括使經冷凍之預凍乾調配物之壓力降低可有效地自該經冷凍之預凍乾調配物中移除該水性溶劑之量；及

(c) 單一「乾燥步驟」，其包括使該經冷凍之預凍乾調配物之溫度增加至高於塌陷溫度，

從而產生凍乾物粉末。在另一態樣中，凍乾制程時間與參考方法(例如具有兩個或更多個乾燥步驟之凍乾制程)相比有所減少。

[0137] 在其他態樣中，藉由本發明方法生產之凍乾物粉末具有一或多個以下特徵：(1)改良該 FIX 多肽之穩定性；(2)減少復原時間；(3)減少潑灑至包含該調配物之封塞上；或(4)增加該凍乾物粉末在室溫下之貨架壽命。

[0138] 在某些實施例中，該塌陷溫度為 -1.5°C 。

[0139] 在某些實施例中，該預凍乾調配物在該冷凍步驟期間係冷凍至約 -65°C 至約 -40°C 、約 -65°C 至約 -45°C 、約 -65°C 至約 -55°C 、約 -60°C 至約 -40°C 、約 -60°C 至約 -50°C 或約 -60°C 至約 -55°C 之冷凍溫度。在某些實施例中，該預凍乾調配物在該冷凍步驟期間係冷凍至約 -55°C 之冷凍溫度。在某些實施例中，該冷凍溫度在該冷凍步驟期間自約 5°C 緩慢降至約 -55°C 。

[0140] 在某些實施例中，在該冷凍步驟期間將該冷凍溫度保持約 30 分鐘至約 5 小時、約 1 小時至約 5 小時、約 1.5 小時至約 5 小時、約 1.5 小時至約 4 小時、約 1.5 小時至約 3 小時或約 1.5 小時至約 2.5 小時。在某些實施例中，在該冷凍步驟期間將該冷凍溫度保持約 2 小時。

[0141] 在某些實施例中，使步驟(a)之經冷凍之預凍乾調配物在該「真空步驟」(b)之前進一步經受「退火步驟」(a')。在某些實施例中，步驟(a)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度在該退火步驟期間緩慢升至約 -15°C 至約 -2°C 之退火溫度。在某些實施例中，步驟(a)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度在該退火步驟期間緩慢升至約 -6°C 之退火溫度。

[0142] 在某些實施例中，在該退火步驟期間將該退火溫度保持約 2 小時至約 4 小時。在某些實施例中，在該退火步驟期間將該退火溫度保持約 30 分鐘至約 5 小時、約 1 小時至約 5 小時、約 2 小時至約 5 小時、約 2 小時至約 4 小時或約 2.5 小時至約 3.5 小時。在某些實施例中，在該退火步驟期間將該退火溫度保持約 3 小時。

[0143] 在某些實施例中，經冷凍之預凍乾調配物之溫度在該退火步驟期間自該退火溫度緩慢降至約 -65°C 至約 -40°C 之溫度。在某些實施例中，經冷凍之預凍乾調配物之溫度在該退火步驟期間自該退火溫度緩慢降至 -55°C 之溫度。

[0144] 在某些實施例中，該「真空步驟」包括使經冷凍之預凍乾調配物經受介於約 0.05 與約 1 毫巴之間、介於約 0.05 與約 0.50 毫巴之間、介於約 0.10 與約 0.50 毫巴之間、介於約 0.15 與約 0.50 毫巴之間、介於約 0.20 與約 0.50 毫巴之間或介於約 0.25 與約 0.50 毫巴之間的真空。在某些實施例中，該「真空步驟」中之真空為約 0.33 毫巴。

[0145] 在某些實施例中，在該「真空步驟」中將真空保持約 5 小時、約 4 小時、約 3 小時、約 2 小時或約 1 小時。在一些實施例中，在該「真空步驟」中將真空保持約 2 小時。

[0146] 在某些實施例中，該「乾燥步驟」包括使經冷凍之預凍乾調配物之溫度自約 -55°C 緩慢升至約 40°C 之

乾燥溫度。在某些實施例中，該乾燥溫度為至少約 30℃、至少約 32℃、至少約 34℃、至少約 35℃、至少約 36℃、至少約 38℃、至少約 39℃、至少約 40℃。在其他實施例中，該乾燥溫度為約 35℃、約 40℃、約 32℃或約 45℃。

[0147] 在某些實施例中，該乾燥步驟進一步包括將該乾燥溫度保持約 10 小時至約 40 小時、約 10 小時至約 30 小時或約 20 小時至約 30 小時。在某些實施例中，將該乾燥溫度保持約 25 小時。

[0148] 在某些實施例中，該乾燥步驟係在約 0.05 毫巴至約 1 毫巴、介於約 0.05 與約 0.50 毫巴之間、介於約 0.10 與約 0.50 毫巴之間、介於約 0.15 與約 0.50 毫巴之間、介於約 0.20 與約 0.50 毫巴之間或約 0.20 毫巴至約 0.45 毫巴之壓力下進行。在某些實施例中，在該乾燥步驟期間將壓力保持在約 0.33 毫巴。單位毫巴可轉換成托或任何其他單位。舉例而言，1 毫巴可轉換成 0.75006375541921 托。

[0149] 在一個態樣中，本揭示案提供一種生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末的方法，其包括：

(a) 「冷凍步驟」，其包括藉由使溫度經約 2 小時緩慢降至約 -55℃之冷凍溫度且將該冷凍溫度保持約 2 小時來冷凍包含 FIX 多肽之預凍乾調配物；

(a') 「退火步驟」，其包括使該步驟(a)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度經約 1.5 小時緩慢升至約 -6℃之退火溫度，將該退火溫度保持約 3 小時且使該溫度經約 1.5 小時

緩慢降至約 -55°C ；

(b) 「真空步驟」，其包括將步驟(a')之經冷凍之預凍乾調配物在約 -55°C 下在大氣壓下保持 2 小時且使該壓力經約 2 小時緩慢降至約 0.33 毫巴；及，

(c) 單一「乾燥步驟」，其包括在將壓力保持在約 0.33 毫巴的同時使步驟(b)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度經 3 小時緩慢升至約 40°C ，及在將壓力保持在約 0.33 毫巴的同時將該經冷凍之預凍乾調配物之溫度在約 40°C 下保持約 25 小時，

從而產生該凍乾物粉末。在一些實施例中，該凍乾方法花費較少循環時間。

[0150] 在某些實施例中，藉由本文中所描述之方法生產之凍乾物粉末具有以下特徵：

- (1) 改良該 FIX 多肽之穩定性；
- (2) 減少復原時間；
- (3) 減少潑灑至包含該調配物之封塞上；
- (4) 增加凍乾物粉末在室溫下之貨架壽命；或
- (5) 其任何組合，

[0151] 在一些實施例中，該凍幹循環週期可少於約 4.5 天、約 4 天、約 3.5 天、約 3 天、約 2.5 天或約 2 天。在其他實施例中，該凍幹循環週期為約 3 天或更短。在某些實施例中，該凍乾法中所使用之預凍乾調配物之填充體積小於約 5 mL。在某些實施例中，該填充體積為約 4 mL、約 3.5 mL、約 3.0 mL、約 2.9 mL、約 2.8 mL、約

2.7 mL、約 2.65 mL、約 2.6 mL、約 2.5 mL、約 2.4 mL、約 2.3 mL、約 2.2 mL、約 2.1 mL 或約 2.0 mL。在一個實施例中，該填充體積為約 2.65 mL。

[0152] 在某些實施例中，藉由該凍乾法生產之凍乾物粉末之減少之復原時間少於約 1.5 分鐘、少於約 1 分鐘、少於約 50 秒、少於約 40 秒、少於約 30 秒、少於約 20 秒或少於約 10 秒。在某些實施例中，藉由該凍乾法生產之凍乾物粉末之減少之復原時間少於約 30 秒。

[0153] 在某些實施例中，該凍乾法中所使用之預凍乾調配物之減少之凍乾循環時間為約 4 天或更少、約 3 天或更少、約 2 天或更少或者約 1 天或更少。

[0154] 在一些實施例中，該凍乾物粉末係在約 90 小時或更少時間內、約 80 小時或更少時間內、約 70 小時或更少時間內、約 60 小時或更少時間內、約 50 小時或更少時間內、約 45 小時或更少時間內、約 40 小時或更少時間內或約 30 小時或更少時間內由該預凍乾調配物產生。在某些實施例中，該凍乾物粉末係在約 45 小時或更少時間內由該預凍乾調配物產生。

[0155] 在某些實施例中，該凍乾物粉末中之殘餘水分少於約 1.0%、約 0.7%、約 0.6%、約 0.5%、約 0.4%或約 0.3%。在一些實施例中，該凍乾物粉末中之殘餘水分少於約 0.5%。

[0156] 在一個態樣中，本揭示案提供一種使包含 FIX 多肽之凍乾物粉末穩定之方法，該方法包括根據本文中所

描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就藉由使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法製備之凍乾物粉末而言，該凍乾物粉末經穩定，如藉由尺寸排除層析法(SEC)所量測。

[0157] 在另一態樣中，本揭示案提供一種增加包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之貨架壽命之方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就藉由使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法製備之凍乾物粉末之貨架壽命而言，該凍乾物粉末之貨架壽命有所增加，如藉由 SEC 及/或 FIX 凝結活性分析法所量測。

[0158] 本揭示案亦提供一種減少包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之復原時間的方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就藉由使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法製備之凍乾物粉末之復原時間而言，該凍乾物粉末之復原時間有所減少。

[0159] 本揭示案進一步提供一種減少生產包含 FIX 多肽之凍乾物粉末之凍乾制程時間的方法，該方法包括根據本文中所描述之方法將預凍乾調配物凍乾，其中就使用包括多於一個乾燥步驟之凍乾法生產凍乾物粉末之凍乾制程時間而言，該預凍乾調配物之凍乾制程時間有所減少。

[0160] 現已詳細描述本發明，藉由參考以下實例將更清楚地理解本發明，該等實例僅出於說明之目的包括在此而不意欲限制本發明。本文中所提及之所有專利及出版物明確地以引用之方式併入。

實例

實例 1：因子 IX-Fc 原料藥及藥物製品組合物

rFIXFc 描述

[0161] rFIXFc 為由共價連接於人類免疫球蛋白 G1 (IgG1)之 Fc 域的人類凝血因子 IX (FIX)組成的長效充分重組融合蛋白質。rFIXFc 之因子 IX 部分具有與血漿衍生因子 IX 之 Thr¹⁴⁸ 等位基因形式一致且具有類似於內源因子 IX 之結構及功能特徵的一級胺基酸序列。rFIXFc 之 Fc 域含有 IgG1 之鉸鏈區、CH2 區及 CH3 區。rFIXFc 含有 869 個胺基酸，分子量為約 98 千道爾頓。

[0162] 在人胚腎 (HEK) 中藉由重組 DNA 技術產生 rFIXFc 且隨後純化。

[0163] 包含 rFIXFc 之本發明 rFIXFc 藥物製品調配物可允許開發高濃度藥物製品，例如 4000+ IU/小瓶藥物製品強度。由此需要原料藥中之 rFIXFc 蛋白濃度較高，如以下比較表 1 中所示。本發明之 rFIXFc 藥物製品調配物可增加 250 及 500 IU/小瓶藥物製品強度之貨架壽命以允許增加室溫穩定性。開發資料表明，250 及 500 IU/小瓶藥物製品強度在加速條件下與參考藥物製品相比顯著更穩定。

[0164] 本發明之 rFIXFc 藥物製品調配物當凍乾時亦可減少復原時間。參考藥物製品復原時間在 1 至 2 分鐘之間變化。開發資料表明，LCM 藥物製品使復原時間減至少於 30 秒。

[0165] 本發明之 rFIXFc 藥物製品調配物亦可允許減少凍乾制程時間。當前，凍乾循環為約 4.5 天。在較低小瓶填充體積之情況下，此時間可能減至約 3 天或更少以達成更經濟之製造。

原料藥 (DS)

[0166] 本發明之 rFIXFc 調配物之原料藥將使用與參考原料藥相同之調配賦形劑。在原料藥製造期間使用第二超濾步驟將達成較高濃度。參見表 1。

表 1：原料藥組成

原料藥組成		
組分	參考藥物製品	藥物製品
r 因子 IX-Fc	10-13 mg/mL	65-75 mg/mL
L-組胺酸	3.88 mg/mL (25 mM)	3.88 mg/mL (25 mM)
聚山梨醇酯 20	0.1 mg/mL (0.01 %)	0.1 mg/mL (0.1 %)

藥物製品 (DP)

[0167] 為了實現上述目標，設計參考藥物製品之所有組分(蛋白質及賦形劑)之濃度加倍的藥物製品，同時在凍乾之前減少小瓶之填充體積。由此確保投與患者之所有組分之劑量保持恆定，同時改良上述藥物製品效能參數。

[0168] 以下表 2 至表 4 詳細描述凍乾進料之組成、凍乾後小瓶中固體製品之含量及復原後之組成。重要的是注意到 rFIXFc 蛋白濃度之廣泛差異。由於各批次因子 IX

在其活性(IU/mg)方面稍有不同，故使用所分析之活性混配進料。由此產生一定範圍之蛋白質濃度，且此差異加藥物製品之不同濃度產生下文所述之範圍。

表 2：藥物製品-預凍乾調配物組成

藥物製品凍乾進料組成			
組分	參考藥物製品 250-2000 IU/小瓶	參考藥物製品 3000 IU/小瓶	藥物製品 250-5500 IU/小瓶
r因子IX-Fc	0.45-9.5 mg/mL	5.5-13.7 mg/mL	0.9-50 mg/mL
	40-500 IU/mL	480-750 IU/mL	80-2750 IU/mL
L-組胺酸	3.88 mg/mL	3.88 mg/mL	7.76 mg/mL
	(25 mM)	(25 mM)	(50 mM)
甘露醇	23.8 mg/mL	23.8 mg/mL	47.6 mg/mL
	(131 mM)	(131 mM)	(261 mM)
蔗糖	11.9 mg/mL	11.9 mg/mL	23.8 mg/mL
	(35 mM)	(35 mM)	(70 mM)
聚山梨醇酯20	0.1 mg/mL	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL
	(0.01 %)	(0.01 %)	(0.2 %)
進料填充體積	5.3 mL	7.4 mL	2.65 mL

表 3：藥物製品-凍乾物組成

藥物製品凍乾小瓶固體組成			
組分	參考藥物製品 250-2000 IU/小瓶	參考藥物製品 3000 IU/小瓶	藥物製品 250-5500 IU/小瓶*
r因子IX-Fc	2.2-46 mg/小瓶	28-69 mg/小瓶	2.2-125 mg/小瓶
L-組胺酸	19.4 mg/小瓶	27.2 mg/小瓶	19.4 mg/小瓶
甘露醇	119 mg/小瓶	167 mg/小瓶	119 mg/小瓶
蔗糖	59.5 mg/小瓶	83.3 mg/小瓶	59.5 mg/小瓶
聚山梨醇酯20	0.5 mg/小瓶	0.7 mg/小瓶	0.5 mg/小瓶

*值為不包括溢流之標稱值。包括溢流之值為：20.6 mg/小瓶(L-組胺酸)、126.01 mg/小瓶(甘露醇)、63.1 mg/小瓶(蔗糖)及 0.53 mg/小瓶(聚山梨醇酯)。

表 4：藥物製品-復原調配物組成
復原後藥物製品小瓶組成

組分	參考藥物製品 250-2000 IU/小瓶	參考藥物製品 3000 IU/小瓶	藥物製品 250-5500 IU/小瓶
稀釋劑	5.2 mL含NaCl之注射用水		
r因子IX-Fc	0.45-9.5 mg/mL	5.5-13.7 mg/mL	0.9-50.0 mg/mL
	40-500 IU/mL	480-750 IU/mL	80-2750 IU/mL
L-組胺酸	3.88 mg/mL	5.43 mg/mL	3.88 mg/mL
	(25 mM)	(35 mM)	(25 mM)
甘露醇	23.8 mg/mL	33.3 mg/mL	23.8 mg/mL
	(131 mM)	(183 mM)	(131 mM)
蔗糖	11.9 mg/mL	16.7 mg/mL	11.9 mg/mL
	(35 mM)	(48 mM)	(35 mM)
聚山梨醇酯20	0.1 mg/mL	0.14 mg/mL	0.1 mg/mL
	(0.01 %)	(0.014 %)	(0.01 %)
復原緩衝液	3.25 mg/mL	3.25 mg/mL	3.25 mg/mL
復原體積	5.3 mL	5.3 mL	5.3 mL

實例 2：用於第二代 rFIXFc 藥物製品之凍乾週期參數之開發概述

[0169] 本研究之目的在於評估本發明 rFIXFc 藥物製品之凍乾循環之乾燥階段制程參數之範圍。

[0170] 本報導彙總評估凍乾制程參數(乾燥擱板溫度、腔室真空度及乾燥時間)及其對乾燥期間之製品溫度、藥物製品之所得殘餘水分及乾燥速率之作用的統計實驗設計(DOE)研究。

[0171] 關於第二代 rFIXFc 藥物製品之初步凍乾循環設計實驗顯示，由於調配物之約 -1.5℃ 之高塌陷溫度而不

必要存在不同的初次及二次乾燥步驟。開發 12 實驗實驗設計(DOE)研究以評估擱板溫度、真空度及乾燥時間對殘餘水分含量及安慰劑對凍乾制程中之製品溫度的作用。對資料之分析顯示，為了達成殘餘水分含量低於 1%，在乾燥階段期間需要 30℃之最低擱板溫度。分析亦顯示長於 25 小時之乾燥時間不會進一步減少小瓶中之殘餘水分，且腔室真空度對殘餘水分僅具有較小影響。擱板溫度及腔室真空度顯著影響乾燥期間之製品溫度，但該研究中最具侵襲性之乾燥條件(40℃擱板溫度，1000 毫托腔室真空度)導致製品溫度比塌陷溫度低 10℃以上。小瓶品質流主要隨擱板溫度而變化，且為了維持真空控制，將需要市售凍乾器能夠處理 0.7 g/h/小瓶之水分流率。建議使用 40℃之擱板溫度、250 毫托(0.33 毫巴)之腔室真空度及 25 小時之乾燥時間來進行凍乾循環以達成製品具有< 0.5%殘餘水分。

引言

[0172] 設計第二代因子 IX-Fc (rFIXFc-2G)藥物製品組合物以允許改良加速儲存期間之蛋白質穩定性、改良復原時間及減少填充體積以減少潑灑至封塞上。此係藉由將填充體積自 5.3 mL 減至 2.65 mL 且使調配物中之蛋白質及賦形劑之濃度加倍，從而使復原產物與第一代組合物相同來實現。減少填充體積之另一益處為減少凍乾制程中需要移除之水的量。

[0173] 由於新藥物製品設計需要再驗證藥物製品制

程，故再開發凍乾循環。據量測安慰劑調配物之塌陷溫度為約 -1.5°C ，由此將允許使用比針對參考 rFIXFc 凍乾制程所設計之凍乾循環短的凍乾循環。由初步實驗確定，不需要進行單獨初次乾燥步驟，因為製品即使在擱板溫度超過 40°C 時亦不發生塌陷。使用參考藥物製品之冷凍概況設計循環，與直接步驟組合在施加真空之後達到初次乾燥溫度。安慰劑為活性 rFIXFc-2G 小瓶之良好替代物，因為甘露醇為餅體提供結晶結構，使得外觀與活性小瓶相同。與蛋白質相比，非晶糖亦更難以乾燥，因此所得殘餘水分略高，從而提供該制程之最壞情況值。自小瓶中移除蛋白質亦降低水蒸氣耐受性，從而獲得小瓶品質流率之最壞情況估計值。

[0174] 進行統計實驗設計(DOE)研究以評估凍乾制程參數(乾燥擱板溫度、腔室真空度及乾燥時間)及其對乾燥制程期間之製品溫度、藥物製品之所得殘餘水分及乾燥速率的影響。

材料及方法

[0175] 本研究之目的在於評估第二代 rFIXFc 藥物製品之凍乾循環之乾燥階段制程參數之範圍。JMP 9 中用於設計 DOE 研究之乾燥階段參數及範圍示於表 5 中。顯示個別運作參數設定點之所得 12 實驗 DOE 計畫示於表 6 中。

表 5：DOE 研究設計中所使用之乾燥參數範圍

乾燥 DOE 參數	最小值	最大值
擱板溫度(°C)	0	40
腔室真空度(毫托)	100	1000
乾燥時間(h)	15	35

表 6：得自 JMP 9 之實驗研究設計範本輸出

運作	溫度 (C)	真空度 (mT)	時間 (h)
1	40	100	35
2	0	100	15
3	40	1000	25
4	20	100	28.2
5	20	500	25
6	0	100	25
7	20	550	25
8	40	250	15
9	20	1000	15
10	0	1000	35
11	10	500	25
12	40	500	25

[0176] 對於本研究中之各凍乾循環，將 80 個 10 mL Schott 小瓶 (P/N: 68000320) 填充 2.75 mL 如表 7 中所示之第二代 rFIXFc 安慰劑，由此提供最壞情況填充體積用於殘餘水分評估。對於各實驗，將經填充之小瓶排列在具有三個熱電偶之單一擱板上，如圖 1 中所示。

表 7：第二代 rFIXFc 藥物製品安慰劑處方

組分	FW	g/L	mM	%(w/v)
組胺酸	155.15	7.76	50.00	0.776
PS-20	1227.54	0.2	0.1629	0.020
甘露醇	182.172	47.6	261.29	4.760
蔗糖	342.30	23.8	69.53	2.380
	$\rho=$	1.029	g/mL	

[0177] 所使用之凍乾循環為表 8 中所示之循環變化。凍乾器擱板乾燥溫度、乾燥步驟時間及乾燥真空度係基於表 6 中所示之實驗設計表而變化。將 SP 工業用 Lyostar II 用於各凍乾循環，且將小瓶置於中間擱板上。

表 8：顯示溫度、時間及真空之 DOE 輸入的凍乾循環參數

階段	步驟	溫度(°C)	斜率 (°C/min)	浸泡(min)	真空(mT)
裝載	裝載	25	-	視需要	-
冷凍	平衡	0	0.5	60	-
	冷凍	-55	0.5	120	-
	退火	-6	0.5	180	-
	冷凍	-55	0.5	120	-
降溫	初始真空	-55	-	-	DOE 真空
乾燥	1°/2°乾燥	DOE 溫度	直接步驟	DOE 時間	DOE 真空
最終	最終	5	5.0	視需要	DOE 真空

[0178] 在各凍乾循環之後，從角落及中間位置選擇五個小瓶且使用程式 TDMP-74 量測殘餘水分，並且求取擱板上之平均值。使用熱電偶且藉由 Lyostar II 軟體中之

壓力溫度量測來量測乾燥期間之製品溫度及小瓶品質流率。使用 JMP 9 軟體分析此等輸出以評估乾燥參數對第二代 rFIXFc 凍乾制程之影響。進行 JMP 逐步分析以確定重要變數，且隨後使用可顯示制程輸出(殘餘水分、製品溫度及乾燥期間之品質流)如何回應於輸入變數的標準最小平方效應篩選演算法分析此等變數。

結果及論述

[0179] 十二個凍乾實驗之結果示於表 9 中。

表 9：殘餘水分、小瓶品質流及製品溫度之 DOE 結果

運作	溫度 (C)	真空度 (mT)	時間 (h)	NB Ref	% 水分	dm/dt (g/h/小瓶)	Tp (MTM, °C)
1	40	100	35	16322-117	0.33	0.53	-26.5
2	0	100	15	16322-110	2.82	0.28	-32.2
3	40	1000	25	16322-090	0.57	0.45	-15.2
4	20	100	28.2	16322-139	1.28	0.41	-29.5
5	20	500	25	16322-098	1.58	0.57	-20.3
6	0	100	25	16322-151	2.18	0.27	-32.5
7	20	550	25	16322-146	1.49	0.56	-19.7
8	40	250	15	18266-004	0.59	0.70	-21.9
9	20	1000	15	16322-131	1.95	0.38	-15.6
10	0	1000	35	16322-124	2.56	0.17	-15.8
11	10	500	25	16322-104	2.01	0.35	-21.8
12	40	500	25	16322-083	0.49	0.56	-19.8

1. 分析凍乾週期參數對殘餘水分之影響

[0180] 使用 rFIXFc-2G 安慰劑作為藥物製品之最壞情況替代物，因為與蛋白質相比，在二次乾燥期間一般更難以自糖中移除殘餘水分。顯示 DOE 分析結果之所得預測分佈示於圖 2 中。顯而易見若干觀察結果：擱板溫度對

藥物製品中之殘餘水分具有最顯著之影響。基於移除強結合水之二次乾燥為擴散及解吸控制制程，此結果為預期的。該模型以高信賴度預計需要擱板溫度高於 30℃來達成殘餘水分含量低於 1%。真空度看似對所得殘餘水分具有較小但可量測之影響。乾燥時間看似顯示收益遞減點起始於 25 小時，其中進一步增加乾燥時間不會繼續降低殘餘水分含量。此種特性與動力學性質接近由擱板溫度決定之平衡邊界一致，且殘餘水分接近不可能進一步乾燥之漸近線。基於此殘餘水分 DOE 分析，乾燥擱板溫度應為 30℃或更高，且乾燥時間應固定在 25 小時或更少。

2. 分析凍乾循環參數在昇華期間對製品溫度之影響

[0181] 據量測，rFIXFc-2G 藥物製品安慰劑之冷凍乾燥塌陷溫度為約 -1.5℃。實際上，此意謂藥物製品將維持精緻餅體結構，只要在凍乾期間自小瓶中移除體積水時維持製品溫度低於此塌陷溫度即可。DOE 分析確定擱板溫度及腔室真空度兩者均對製品溫度具有顯著影響，如圖 3 中所示。腔室真空具有最大影響，其中在昇華期間，壓力愈高，製品溫度愈高。即使在 1000 毫托(1.33 毫巴)下，最高量測製品溫度為 -15.2℃，比製品塌陷溫度低約 13℃。擱板溫度亦對製品溫度具有中度影響，但結果與真空效果相比不那麼明顯。此分析顯示，即使在 40℃之擱板溫度及 1000 毫托之腔室真空度下，亦存在極小塌陷風險，從而基本上消除任何實際凍乾循環設計空間的塌陷可能性。

3. 分析凍乾循環參數在昇華期間對小瓶品質流率之影響

[0182] 小瓶品質流率(dm/dt)為在昇華制程期間水自小瓶中移除之速率的量度。儘管需要快速乾燥以減少凍乾循環所需之時間，但過多水分可能覆沒製造規模冷凍乾燥機中之冷凝器，且導致喪失製品腔室中的真空控制。安慰劑代表最壞情況小瓶品質流條件。因為調配物中不存在蛋白質，故餅體中之固體百分比得以最小化且由此導致對來自經冷凍乾燥之餅體的品質流的耐受性較低。擱板溫度對小瓶品質流具有顯著影響，如圖 4 中所示，其中增加溫度導致更快昇華。將腔室真空度包括在 DOE 分析模型中，但 p 值為 0.136，在 95%信賴度下並不顯著。本研究中之最高量測 dm/dt 為 0.7 g/h/小瓶。

4. 基於安慰劑 DOE 研究之建議第二代 rFIXFc 凍乾循環

[0183] 得自安慰劑 DOE 研究之資料表明，設計凍乾循環以使用單一乾燥步驟達成 < 0.5%之殘餘水分目標同時維持製品低於其塌陷溫度具有可行性。建議凍乾循環示於表 10 中，且來自在與建議 rFIXFc-2G 凍乾循環類似之條件進行的 DOE 運作 8 的資料示於圖 5 中。選擇 0.5%殘餘水分目標係因為此為第一代 rFIXFc 藥物製品強度系列之平均值。此水分含量提供緩衝，使得在該製品在加速穩定性期間吸收水分時，製品品質屬性不會受到影響。

[0184] 依原樣使用針對參考 rFIXFc 藥物製品凍乾循

環開發之凍乾循環之冷凍及退火部分，且已利用在 40℃ 擱板溫度及 250 毫托真空下持續 25 小時之單一乾燥步驟替換單獨初次乾燥及二次乾燥步驟。

表 10：針對 rFIXFc-2G 之建議凍乾循環

階段	步驟	溫度(°C)	斜率(°C/min)	浸泡(min)	真空(mT)
裝載	裝載	25	-	視需要	-
冷凍	平衡	0	0.5	60	-
	冷凍	-55	0.5	120	-
	退火	-6	0.5	180	-
	冷凍	-55	0.5	120	-
降溫	初始真空	-55	-	-	250
乾燥	1°/2°乾燥	40	0.5	1500	250
最終	最終	5	5.0	視需要	250

結 論

[0185] 完成 12 實驗 DOE 研究，從而評估第二代 rFIXFc 藥物製品凍乾制程參數對安慰劑之殘餘水分、製品溫度及小瓶品質流率之影響。對資料之分析顯示為了達成殘餘水分含量低於 1%，需要乾燥階段期間之最低擱板溫度為 30℃。該分析亦顯示長於 25 小時之乾燥時間不會顯著減少小瓶中之殘餘水分，且真空度對殘餘水分僅具有較小作用。乾燥期間之製品溫度顯著受擱板溫度及腔室真空度影響。該研究中最具侵襲性之條件(40℃ 擱板溫度，1000 毫托腔室真空)導致製品溫度比塌陷溫度低 10℃ 以上。

[0186] 建議使用 40℃ 之擱板溫度、250 毫托(0.33 毫

巴)之腔室真空及 25 小時之乾燥時間進行凍乾循環以達成製品具有 $< 0.5\%$ 殘餘水分。

[0187] 對特定實施例之上述描述因此將充分顯示本發明之一般特性，從而他人可在不過度實驗、不背離本發明之一般概念的情況下藉由應用熟習此項技術者能力範圍內之知識針對各種應用容易地修改及/或改適該等特定實施例。因此，基於本文中所提供之教示及指導，該等改適及修改意欲在所揭示之實施例之等效物的含義及範圍內。應理解，本文中之措辭或術語係出於描述而非限制之目的，從而熟練技術人員將根據該等教示及指導來解釋本說明書之術語或措辭。

[0188] 本發明之範圍及範疇不應受任何上述例示性實施例限制，而是應僅根據以下申請專利範圍及其等效物加以限定。由考慮本說明書及本文中所揭示之對本發明之實施，本發明之其他實施例對於熟習此項技術者將顯而易見。

[0189] 本說明書中所提及之所有文獻、論文、出版物、專利及專利申請案係以引用之方式併入本文中，其程度如同特定且個別地指示各個別出版物或專利申請案以引用之方式併入。

[0190] 本申請案主張 2015 年 3 月 24 日申請之美國臨時申請案第 61/969,801 號之優先權，該案係以全文引用之方式併入本文中。

序列之表

表 11：FIX 之聚核苷酸序列

FIX-Fc鏈DNA序列(FIX信號肽加下劃線，FIX序列加雙下劃線，Fc區以粗體表示) (SEQ ID NO:1，其編碼SEQ ID NO:2)
pSYN-FIX-030核苷酸序列(nt 1至7583)：
FIX外顯子1 (信號肽，第1個胺基酸前肽)：nt 690-777
FIX迷你內含子：nt 778-1076
FIX序列：nt 1077-2371
Fc：nt 2372-3052

1 gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg
51 gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac
101 ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt
151 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga
201 cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca
251 agtgtatcat atgccaagta cgcgccctat tgacgtcaat gacggtaa
301 ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact
351 tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt
401 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
451 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttggtttg gcaccaa
501 caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaa
551 gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta tataagcaga gctctctggc
601 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac
651 tatagggaga cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgacgcgcgt
701 gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc tgcccttttag
751 gatatctact cagtgtgaa tgtacagggt tgtttccttt tttaaatac
801 attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg ctgtcttctt
851 cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag
901 ccagcacgca gggtggtaag tactgtggga acatcacaga ttttggctcc
951 atgccctaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga

1001 ctttcttaag agatgtaaaa ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac
 1051 taaagaatta ttctttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaacgcca
 1101 acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag
 1151 tttgttcaaq gqaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt
 1201 tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt
 1251 ggaagcagta tgttgatgga gatcagtggt agtccaatcc atgtttaaat
 1301 ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatgtt ggtgtccctt
 1351 tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt aacattaaga
 1401 atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt
 1451 tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga
 1501 accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta
 1551 agctcacccg tgctgagact gtttttcttq atgtggacta tgtaaattct
 1601 actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaagca cccaatcatt
 1651 taatgacttc actcgggttg ttggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat
 1701 tccttggca ggttgttttg aatggtaaaq ttgatgcatt ctgtggaagg
 1751 tctatcgtta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac
 1801 tggtgttaaa attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag
 1851 aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac
 1901 tacaatgcag ctattaataa gtacaacat gacattgcc ttctggaact
 1951 ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg
 2001 acaaggaata cacgaacatc ttctcaaatt ttggatctgg ctatgtaagt
 2051 ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta
 2101 ccttagagtt ccacttggtg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt
 2151 tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga
 2201 gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg aagtggagg
 2251 gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggtgaaagag tgtgcaatga
 2301 aaggcaaata tggaatatat accaaggtgt cccggtatgt caactggatt
 2351 aaggaaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc
 2401 agctccggaa ctctggggcg gaccgtcagt ctctctctc ccccaaaaac
 2451 ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg
 2501 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga

2551 cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca
 2601 acagcacgta ccgtgtggtc agcgteectca ccgtcctgca ccaggactgg
 2651 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc
 2701 ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac
 2751 aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc
 2801 agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga
 2851 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg
 2901 tgttggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac
 2951 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga
 3001 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta
 3051 aatgagaatt cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac
 3101 aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta
 3151 ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt tggggtgggc
 3201 gaagaactcc agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc cagccggcgt
 3251 cccggaac gattccgaag cccaaccttt catagaaggc ggcggtggaa
 3301 tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtctgca tcctcggcca cgaagtgcac
 3351 gcagttgccg gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcccc cacggctgct
 3401 cgccgatctc ggtcatggcc ggcccggagg cgtcccggaa gttegtggac
 3451 acgacctccg accactcggc gtacagctcg tccaggccgc gcacccacac
 3501 ccaggccagg gtgttgtccg gcaccacctg gtccctggacc gcgctgatga
 3551 acagggtcac gtcgtcccg accacaccgg cgaagtcgtc ctccacgaag
 3601 tcccgggaga acccgagccg gtcggtccag aactcgaccg ctccggcgac
 3651 gtcgcgcgcg gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggttt
 3701 agttcctcac cttgtcgtat tatactatgc cgatatacta tgccgatgat
 3751 taattgtcaa cacgtgctga tcagatccga aaatggatat acaagctccc
 3801 gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctactactt
 3851 ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa
 3901 aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg
 3951 ggcgggatgg gcggagttag ggcgggact atgggtgctg actaattgag
 4001 atgcatgctt tgcatacttc tgctgctgg ggagcctggg gactttccac

4051 acctggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct
 4101 ggggagcctg gggactttcc acaccctcgt cgagctagct tcgtgaggct
 4151 ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cgcccacagt ccccgagaag
 4201 ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcg
 4251 ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg
 4301 gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt
 4351 cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccc
 4401 cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt
 4451 ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggcg
 4501 ggccttgccg tttaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg
 4551 cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggggtgacc ttcgcgcctg
 4601 tctcgctgct ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg
 4651 ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaggat
 4701 ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gcgggcgggc acggggcccc
 4751 tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac
 4801 cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct
 4851 ggcctcgcgc cgccgtgtat cggcccgccc tgggcgggcaa ggctggcccc
 4901 gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggcctgctc
 4951 caggggggctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag
 5001 tcacccacac aaaggaaagg ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcatg
 5051 tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat tagttctgga
 5101 gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg
 5151 gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca
 5201 cttgatgtaa ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttgg
 5251 tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag
 5301 gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgcc gccaccatgg agacagacac
 5351 actcctgcta tgggtactgc tgcctctgggt tccaggttcc actggtgaca
 5401 aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg
 5451 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctccc
 5501 gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg
 5551 aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa

5601 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt
 5651 cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca
 5701 aggtctccaa caaagccctc ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa
 5751 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg
 5801 cgatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct
 5851 tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
 5901 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg gctccttctt
 5951 cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg
 6001 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
 6051 aagagcctct cctgtctcc gggtaaata ctcgagagat ctggccggct
 6101 gggcccgttt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggctctgat
 6151 tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac cattgagttt aaaccgcgtg
 6201 atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgccct
 6251 ccccgctgcc ttcttgacc ctggaagggtg ccactcccac tgcctttcc
 6301 taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat
 6351 tctggggggg ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca
 6401 atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa
 6451 agaaccagtg gcggtaatat ggttatccac agaatacagg gataacgcag
 6501 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag
 6551 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca
 6601 caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa
 6651 gataccaggc gtttccccct agaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg
 6701 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt
 6751 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg
 6801 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca gcccgaccgc
 6851 tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga
 6901 cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt
 6951 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac
 7001 actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt
 7051 cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta

7101 gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga
7151 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa
7201 cgaaaactca cgttaagggg ttttggtcat gacattaacc tataaaaata
7251 ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa
7301 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc
7351 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg
7401 ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga
7451 gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa
7501 taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg
7551 gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg cca

表 12：FIX 之多肽序列

FIX-Fc 單體雜交物：藉由共表現 *FIX-Fc* 及 *Fc* 鏈而產生。

A. *FIX-Fc* 鏈 (SEQ ID NO: 2)

任一亞單位中均不存在 c 末端離胺酸；在哺乳動物細胞培養物中產生之重組蛋白質以及血漿衍生蛋白質中常觀察到此處理。

FIX-Fc-SC 亞單位 (*FIX-Fc* 之 *Fc* 部分以粗體表示)：

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

表 13：Fc 之聚核苷酸序列

Fc DNA 序列(小鼠 Igκ信號肽加下劃線)(SEQ ID NO:3，
其編碼 SEQ ID NO:4)

1 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg
51 ttccactggg gacaaaactc acacatgccc accgtgcccac gcacctgaac
101 tcctgggagg accgtcagtc ttctctcttc ccccaaaacc caaggacacc
151 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtgg tggacgtgag
201 ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg
251 tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
301 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa
351 ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga
401 aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc
451 ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg
501 cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca
551 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc
601 gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg
651 gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca
701 accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

表 14：Fc 之多肽序列

Fc 鏈(SEQ ID NO:4)

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

序列表

<110> BIOGEN IDEC MA INC.
Thome, Brian M.
Parkhurst-Lang, Cherie
Leveille, Brandon W.

<120> 凍乾之因子IX調配物

<130> 2159.397PC01/C-K/E-H

<140> 待提交
<141> 隨附

<150> 61/969,801
<151> 2014-03-24

<160> 14

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 7583
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-Fc 鏈

<400> 1
gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag 60
ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaattggc ccgcctggct 120
gaccgccc aa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 180
caatagggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg 240
cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcacctat tgacgtcaat gacggtaa at 300
ggcccgcc tg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttccctact tggcagtaca 360
tctacgtatt agtcatcgct attacatgg tgatgcggtt ttggcaglac atcaatgggc 420
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 480
gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 540
tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta tataagcaga gctctctggc 600
taactagaga acccactgct tacttggtta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga 660
cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgcagcgcgt gaacatgac atggcagaat 720
caccaggcct catcacatc tgccttttag gatattctact cagtgtgaa tgtacaggtt 780
tgtttccitt tttaaatac attgagtatg ctgtccittt agatatagaa atatctgatg 840
ctgtcttctt cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag 900
ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggctcc atgccctaaa 960
gagaaattgg ctltcagatt atttgatta aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa 1020
ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt 1080
tcttgatcat gaaaacgcca acaaaattct gaatcggcca aagaggata attcaggtaa 1140
attggaagag ttgtttcaag ggaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt 1200
tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta 1260
tgttgatgga gatcagtgig agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga 1320
cattaattcc tatgaatggt gggtgccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga 1380

tgtaacatgt aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa	1440
caaggiggtt tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga	1500
accagcagtg ccatittccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccg	1560
tgctgagact gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatitt	1620
ggataacatc actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgggttg ttggtggaga	1680
agatgccaaa ccaggitcaat tcccttggca gggtgttttg aatggtaaag ttgatgcatt	1740
ctgtggaggc tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac	1800
tggtgttaaa attacagttg tcgcagggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga	1860
gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa	1920
gtacaacat gacattgcc tttctggaact ggacgaacct ttagtgctaa acagctacgt	1980
tacacctatt tgcatgtctg acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg	2040
ctatgtaagt ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta	2100
ccttagagtt ccactgttg accgagccac atgtcttcca tctacaaagt tcaccatcta	2160
taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag	2220
tgggggacct catgttactg aagtgggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg	2280
gggtgaagag tgtgcaatga aaggcaata tggaatatat accaagggtg cccggtatgt	2340
caactggatt aaggaaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc	2400
agctccggaa ctccctggcg gaccgtcagt ctctctctc ccccaaaac ccaaggacac	2460
cctcatgac tcccggacct ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga	2520
ccctgaggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa	2580
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtcctgca	2640
ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag cctcccagc	2700
ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac	2760
cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa	2820
aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa	2880
ctacaagacc acgcctcccg tgttggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct	2940
caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga	3000
ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt	3060
cagacatgat aagatacatt gatgagttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa	3120
aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca	3180
ataaacaagt tggggtgggc gaagaactcc agcatgagat cccgcgctg gaggatcatc	3240
cagccggcgt cccggaaaac gattccgaag cccaaccttt catagaaggc ggcggtggaa	3300
tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtcctgc tctcggcca cgaagtgcac gcagttgccg	3360
gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcccc cacggctgct cgccgatctc ggtcatggcc	3420
ggcccgagg cgtcccgaa gtctgtggac acgacctccg accactcggc gtacagctcg	3480
tccaggccgc gcaccacac ccaggccagg gtgttgtccg gcaccacctg gtcttgacc	3540
gcgctgatga acagggtcac gtcgtcccg accacaccgg cgaagtcgtc ctccacgaag	3600

tcccgggaga acccgagccg gtcggtccag aactcgaccg ctccggcgac gtcgcgcgcg	3660
gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggttt agttccctac ctgtcgtat	3720
tatactatgc cgatatacta tgcgcatgat taattgtcaa cacgtgctga tcagatccga	3780
aaatggatat acaagctccc gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc	3840
ctcactactt ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggccctctga taaataaaaa	3900
aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg	3960
gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc	4020
tgcctgctgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc tgactaattg agatgcatgc	4080
tttgatact tctgcctgct ggggagccig gggactttcc acaccctcgt cgagctagct	4140
tcgtgaggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cgccacagt ccccgagaag	4200
ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg ggtaaactgg	4260
gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt ttccccgagg gtgggggaga accgtatata	4320
agtgcatag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta	4380
agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct	4440
tgaattactt ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggcg	4500
ggccttgccg tttaggagcc ctttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgct	4560
ggggccgccc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttccgcctig tctcgctgct ttcgataagt	4620
ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgt tttttctgg caagatagtc	4680
ttgtaaatgc gggccaggat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gcgggcggcg	4740
acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac	4800
cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgctt ggcctcgcgc	4860
cgccgtgtat cggcccgccc tgggcccga ggttgccccg gtcggcacca gtgctgtag	4920
cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc cagggggctc aaaatggagg acgcggcgct	4980
cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaagg ggcctttccg tccctagccg	5040
tgccttcatg tgactccacg gactaccggg cggcgtccag gcacctgat tagttctgga	5100
gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc	5160
acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa ttctccttgg	5220
aatttgcctt ttttgagttt ggtcttgggt tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa	5280
gttttttct tccatttcag gtgtcgtgaa cacgtggctg cggccgcgcc gccaccatgg	5340
agacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca	5400
aaactcacac atgcccaccg tgcacagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc	5460
tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag gtcacatgcg	5520
tgggtggtga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg	5580
tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg	5640
tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca	5700
aggcttccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc	5760
agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccc cgatgagctg accaagaacc	5820
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg	5880

agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg 5940
gctcccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 6000
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct 6060
ccctgtctcc gggtaaatga ctcgagagat ctggccggct gggcccgttt cgaaggtaag 6120
cctatcccta accctctect cggctctgat tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac 6180
cattgagttt aaaccgcgtg atcagcctcg actgtgccct ctagttgccg gccatctgtt 6240
gtttgccccct ccccgtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccactcccac tgtcctttcc 6300
taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt 6360
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat 6420
gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagtg gcggtataac ggttatccac 6480
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 6540
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 6600
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 6660
gtttccccct agaagctccc tcgtgcgtc tctgttccg accctgccgc ttaccggata 6720
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 6780
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca 6840
gcccgaaccg tcgccttat ccggttaact tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga 6900
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggaitagc agagcgaggt atgtaggcgg 6960
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 7020
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaanaaga gttggtagct cttgatccgg 7080
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 7140
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctac gggctctgac ctcagtggaa 7200
cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcac gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 7260
gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 7320
cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 7380
cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 7440
tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 7500
taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcggtg 7560
cgggcctctt cgctattacg cca 7583

<210> 2
<211> 642
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-Fc 鏈

<400> 2

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe

20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
275 280 285

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Asp
405 410 415

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
420 425 430

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
450 455 460

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
465 470 475 480

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
485 490 495

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
500 505 510

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
515 520 525

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
530 535 540

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
545 550 555 560

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
610 615 620

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
625 630 635 640

Gly Lys

<210> 3
<211> 741
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc 部分

<400> 3
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 120
ttccctcttc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 180
tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 240
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 300
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 360
tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgcgatga gctgaccaag 480
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 600
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 720
ctctccctgt ctccgggtaa a 741

<210> 4
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc 部分

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

859095

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100105110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115120125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130135140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145150155160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165170175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180185190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195200205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210215220

Pro Gly Lys
225

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 白蛋白結合肽之核心序列

<400> 5

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1510

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP 肽

<400> 6

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
151015

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
202530

<210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP 肽

<400> 7

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 8

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 9

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 10

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser
20

<210> 11
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 11

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ser

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 12

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala
20

<210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 13

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala
20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 14

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala
20

申請專利範圍

1. 一種預凍乾調配物，其包含：

(a) 濃度介於 220 IU/小瓶與 1,000 IU/小瓶之間之具有 FIX 凝結活性的因子 IX (FIX)多肽，其包含 FIX 及 FcRn 結合搭配物；

(b) 濃度介於 3 mg/mL 與 15 mg/mL 之間之 L-組胺酸；

(c) 濃度介於 10 mg/mL 與 50 mg/mL 之間之蔗糖；

(d) 濃度介於 20 mg/mL 與 100 mg/mL 之間之甘露醇；及

(e) 濃度介於 0.01 mg/mL 與 5 mg/mL 之間之聚山梨醇酯 20，

其中該調配物具有 2 mL 至 3 mL 之填充體積。

2. 如申請專利範圍第 1 項之預凍乾調配物，其中 L-組胺酸之濃度介於 3.88 mg/mL 與 9.7 mg/mL 之間；其中蔗糖之濃度介於 17.85 mg/mL 與 29.95 mg/mL 之間；且其中甘露醇之濃度介於 35.7 mg/mL 與 59.5 mg/mL 之間。

3. 如申請專利範圍第 1 項之預凍乾調配物，其中 L-組胺酸之濃度為 7.76 mg/mL；其中蔗糖之濃度為 23.8 mg/mL；其中甘露醇之濃度為 47.6 mg/mL；且其中聚山梨醇酯 20 之濃度為 0.2 mg/mL。

4. 如申請專利範圍第 1 項之預凍乾調配物，其中該填充體積為 3.0 mL、2.9 mL、2.8 mL、2.7 mL、2.65 mL、2.6 mL、2.5 mL、2.4 mL、2.3 mL、2.2 mL、2.1 mL 或

2.0 mL。

5.如申請專利範圍第 1 項之預凍乾調配物，其中該填充體積為 2.65 mL。

6.如申請專利範圍第 1 項之預凍乾調配物，其中該填充體積為 2.5 mL。

7.如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之預凍乾調配物，其中該 FcRn 結合搭配物為 Fc 或白蛋白。

8.如申請專利範圍第 7 項之預凍乾調配物，其中該 FcRn 結合搭配物為 Fc。

9.如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之預凍乾調配物，其中該 FIX 多肽與 SEQ ID NO: 2 具有 100%一致性。

10.如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之預凍乾調配物，其中該 FIX 多肽包含 SEQ ID NO: 2 之 FIX-Fc 單鏈(FIXFc-sc)多肽及 SEQ ID NO: 4 之 Fc 單鏈(Fc-sc)多肽。

11.如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之預凍乾調配物，其中該 FIX 多肽包含不存在 C 末端離胺酸之 SEQ ID NO: 2 之 FIXFc 單鏈(FIXFc-sc)多肽，及不存在 C 末端離胺酸之 SEQ ID NO: 4 之 Fc 單鏈(Fc-sc)多肽，其中該 FIXFc-sc 多肽及 Fc-sc 多肽係由 Fc 之鉸鏈區中之兩個二硫鍵結合在一起。

12.一種預凍乾調配物，其包含
濃度介於 220 IU/小瓶與 1,000 IU/小瓶之間之 FIX 多肽，其包含 SEQ ID NO: 2 之 FIXFc 單鏈(FIXFc-sc)多肽

及 SEQ ID NO: 4 之 Fc 單鏈(Fc-sc)多肽，

濃度為 7.76 mg/mL 之 L-組胺酸，

濃度為 23.8 mg/mL 之蔗糖，

濃度為 47.6 mg/mL 之甘露醇，

濃度為 0.2 mg/mL 之聚山梨醇酯 20，及

其中該調配物之填充體積為 2.65 mL。

13.一種凍乾物粉末，其係由如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之預凍乾調配物凍乾。

14.一種復原調配物，其包含藉由復原緩衝液復原之如申請專利範圍第 13 項之凍乾物粉末。

15.一種小瓶，其包含如申請專利範圍第 13 項之凍乾物粉末。

16.一種套組，其包括包含如申請專利範圍第 13 項之凍乾物粉末之第一容器及包含復原緩衝液之第二容器，該復原緩衝液之體積當與該第一容器之凍乾調配物組合時足以產生如申請專利範圍第 14 項之復原調配物。

17.一種包含如申請專利範圍第 14 項之復原調配物之醫藥組成物用於製造供預防或降低 B 型血友病患者之出血發作之頻率或嚴重程度之藥物的用途。

18.一種由如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之預凍乾調配物製造凍乾 FIX 多肽之方法，其包括：

(a) 「冷凍步驟」，其包括將包含該 FIX 多肽及水性溶劑之預凍乾調配物冷凍至 -65°C 至 -40°C 之冷凍溫度；

(b) 「真空步驟」，其包括使經冷凍之預凍乾調配物

之壓力降低可有效地自該經冷凍之預凍乾調配物中移除該水性溶劑之量；及

(c) 單一「乾燥步驟」，其包括使該經冷凍之預凍乾調配物之溫度增加至高於 -1.5°C 的塌陷溫度，從而產生凍乾物粉末。

19.如申請專利範圍第 18 項之方法，

其中該預凍乾調配物之溫度在該冷凍步驟期間自 5°C 緩慢降至冷凍溫度，且其中在該冷凍步驟期間將該冷凍溫度保持 30 分鐘至 5 小時，

其中步驟(a)之該經冷凍之預凍乾調配物在該「真空步驟」(b)之前進一步經受「退火步驟」(a')，其中該步驟(a)之經冷凍之預凍乾調配物之溫度在該退火步驟期間緩慢升至 -15°C 至 -2°C 之退火溫度，且其中在該退火步驟期間將該退火溫度保持 30 分鐘至 5 小時，

其中該經冷凍之預凍乾調配物之溫度在該退火步驟期間自該退火溫度緩慢降至 -65°C 至 -40°C 之溫度，

其中該「真空步驟」包括使該經冷凍之預凍乾調配物經受介於 0.05 毫巴與 1 毫巴之間的真空 2 小時，且/或

其中該「乾燥步驟」包括使該經冷凍之預凍乾調配物之溫度自 -55°C 緩慢升至 40°C 之乾燥溫度，其中將該乾燥溫度保持 10 小時至 40 小時，且其中在 0.05 毫巴至 1 毫巴之壓力下進行該乾燥步驟。

20.如申請專利範圍第 18 或 19 項之方法，其中該預凍乾調配物在步驟(a)之前經無菌過濾且無菌填充至小瓶

中；其中該凍乾物粉末係在 45 小時或更短時間內由該預凍乾調配物產生；且/或其中該凍乾物粉末中之殘餘水分少於 0.7%。

圖 式

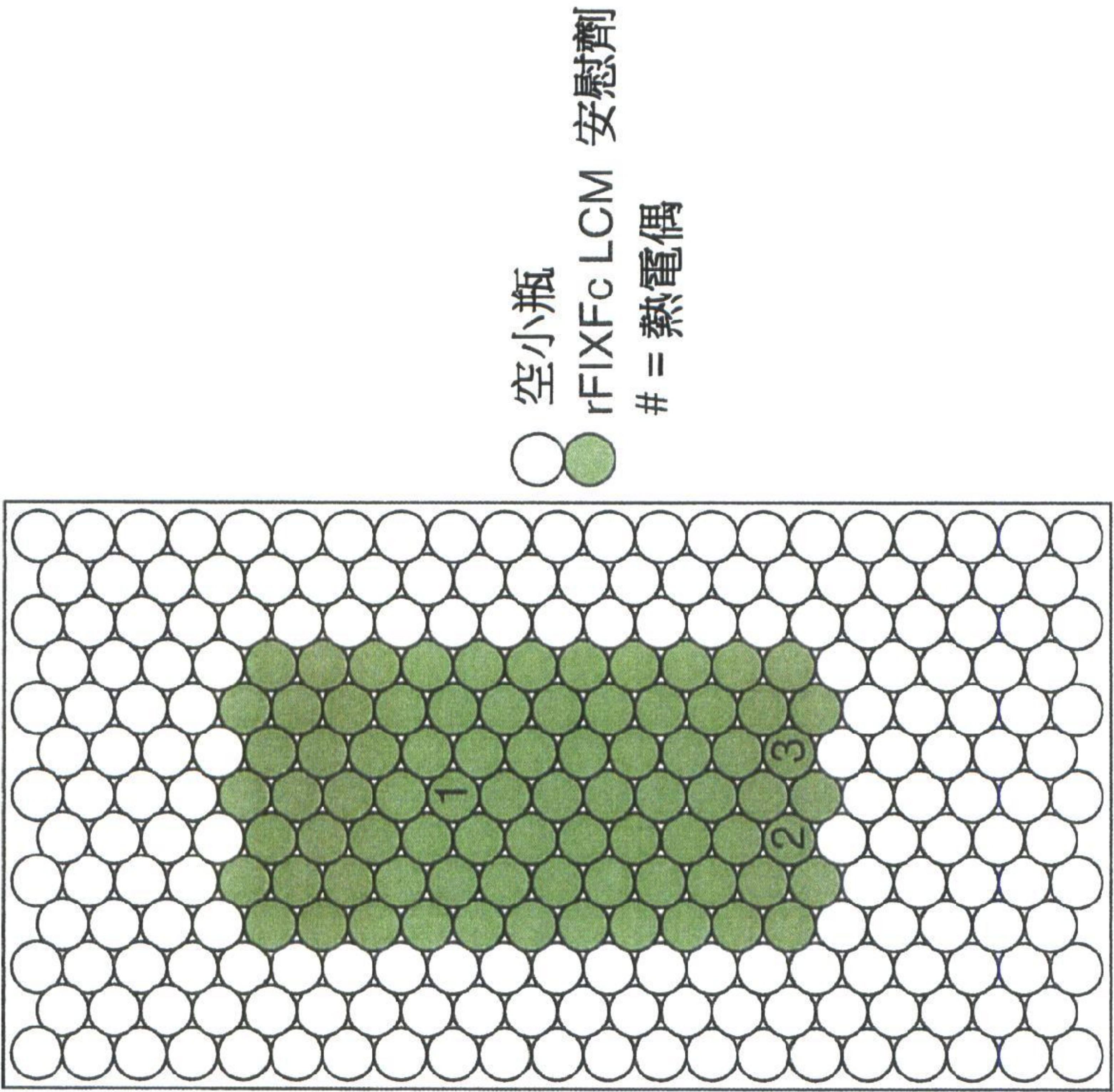


圖 1

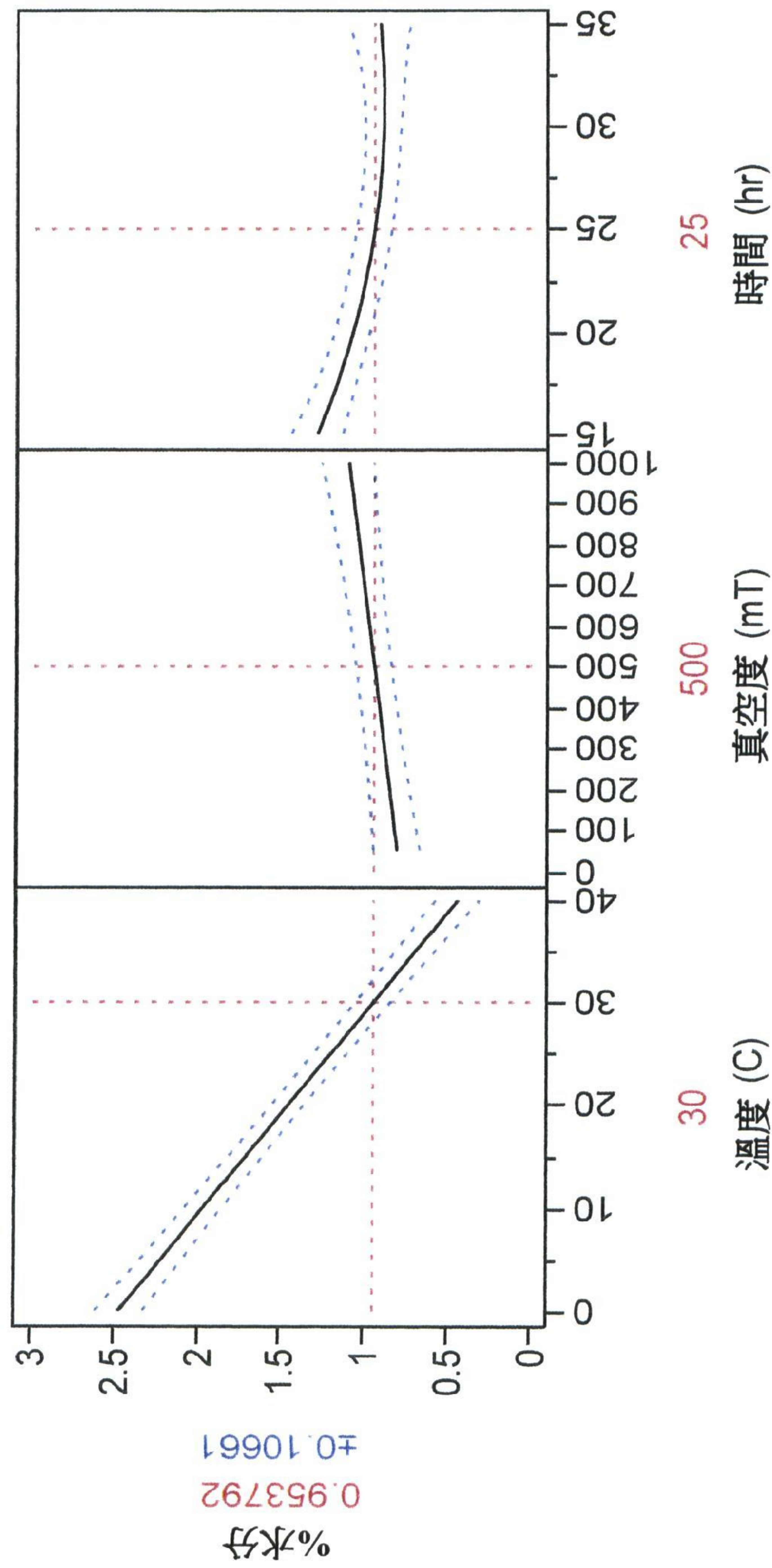


圖 2

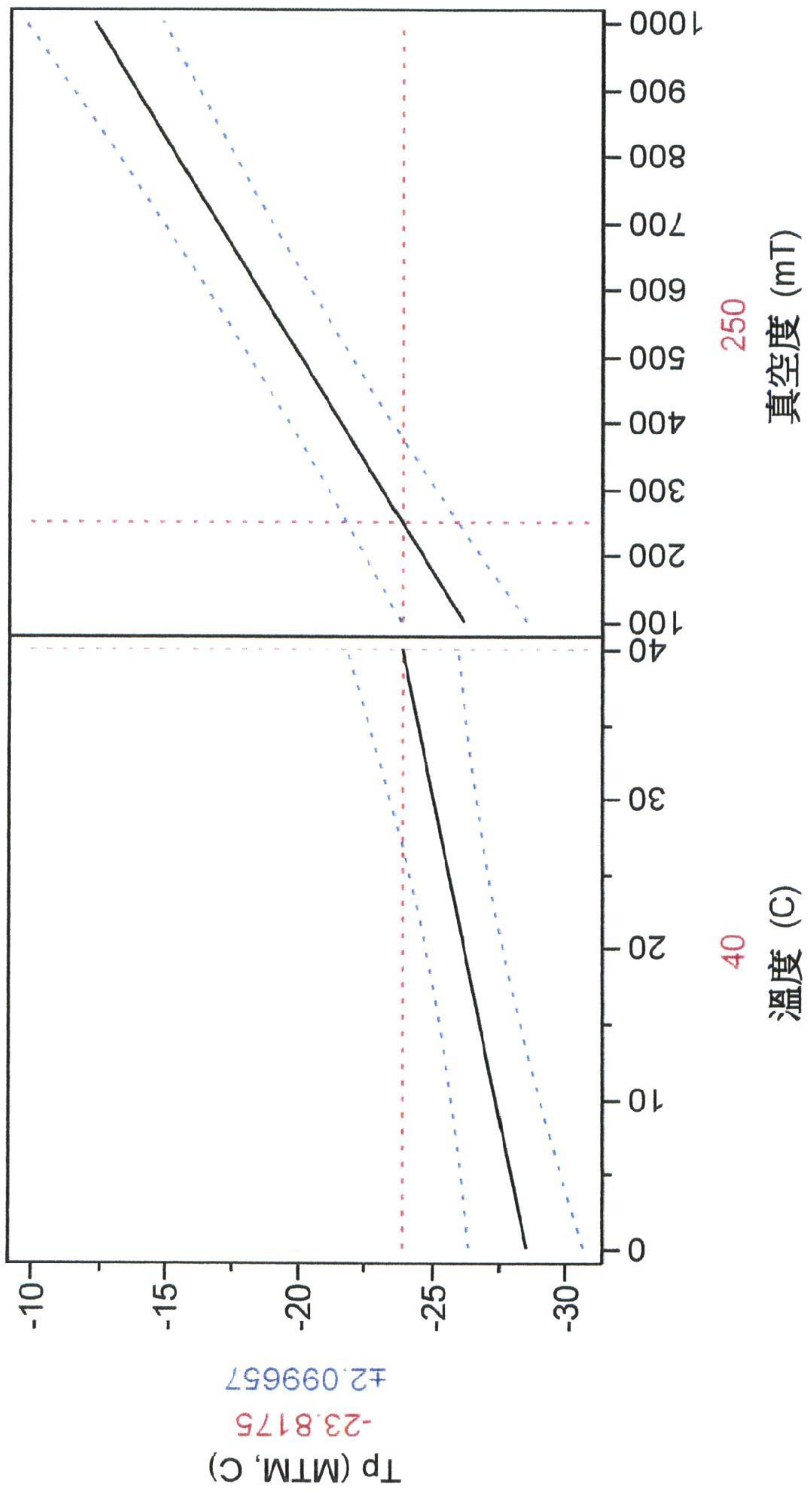


圖 3

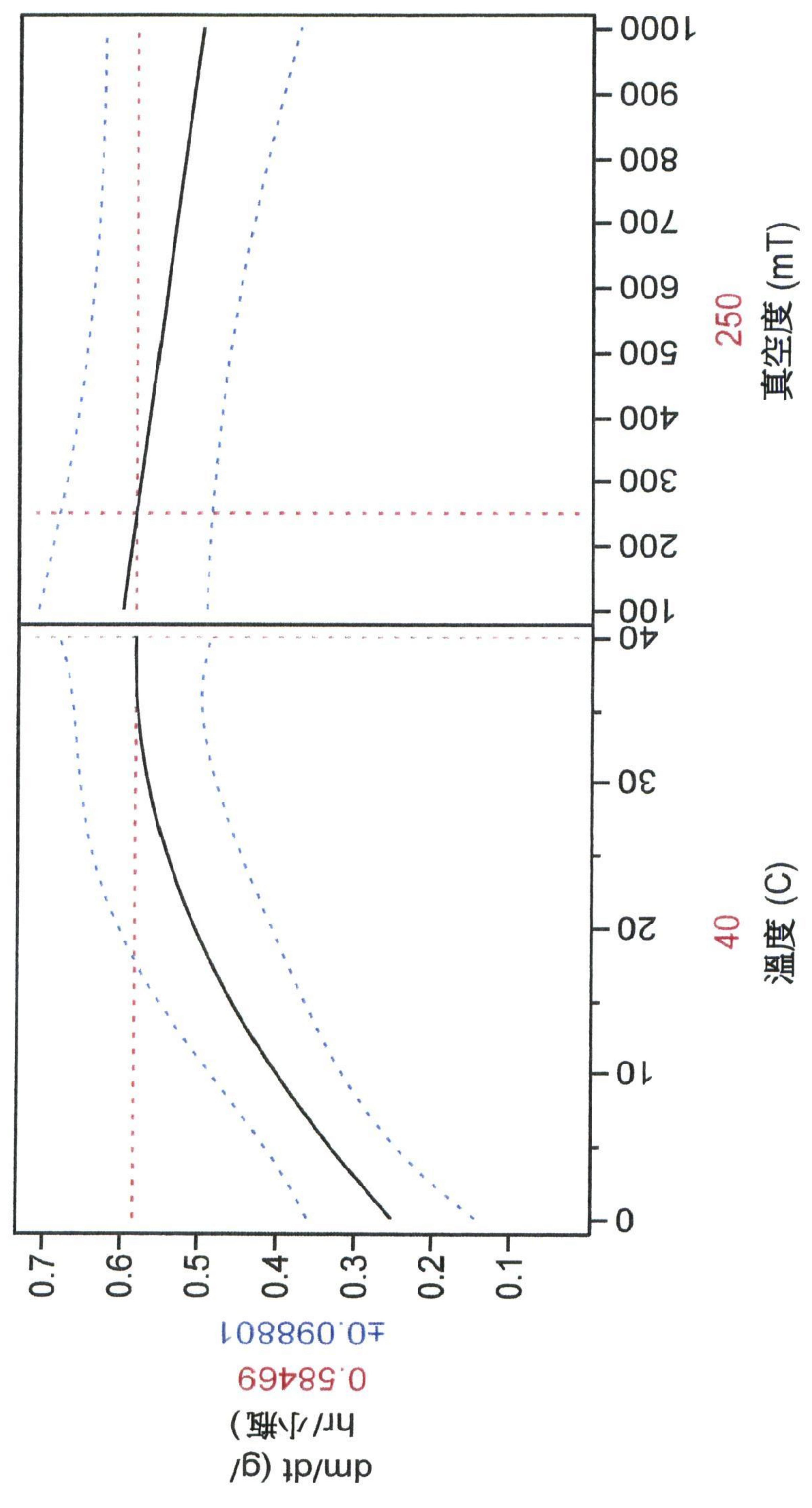


圖 4

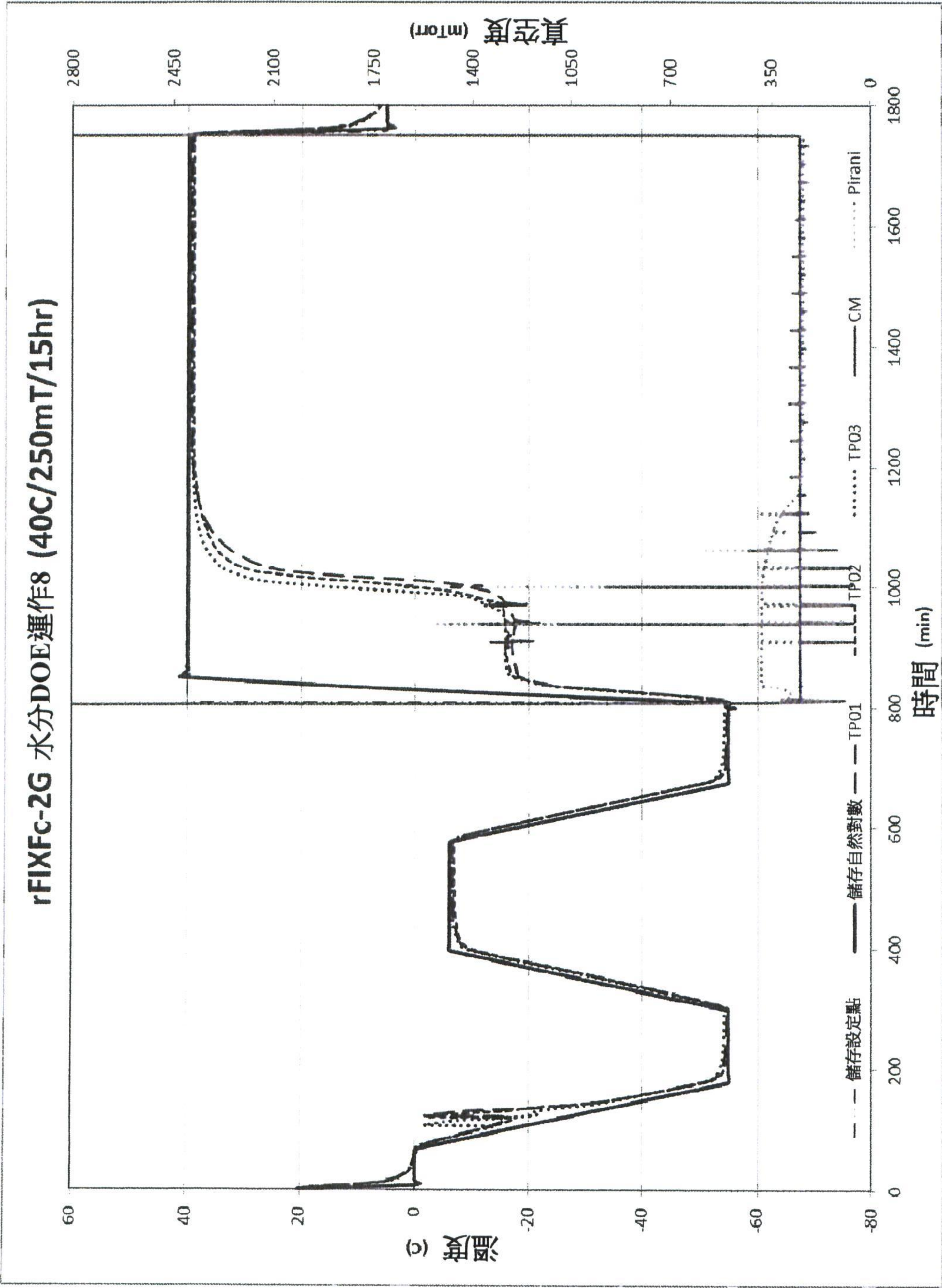


圖 5