(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110799209 A
(43)申请公布日 2020.02.14

(21)申请号 201880042643.9

(22)申请日 2018.06.29

(30)优先权数据
62/526,377 2017.06.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/067523 2018.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/002532 EN 2019.01.03

(71)申请人 康诺贝林伦瑙有限公司
地址 瑞士伦瑙

(72)发明人 李艳艳 D·本森-肯尼迪 I·雅各布 C·沃格特

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.
A61K 38/48(2006.01)
C12N 9/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

用于预防性治疗血友病的包含因子IX和人白蛋白的融合蛋白的21天给药方案及其方法

(57)摘要

本发明涉及预防性给药方案,其中以约三周(例如,21天)的给药间隔使用约90-110IU/kg的长效因子IX(人FIX-人白蛋白)。

CN 110799209 A

1.包含以下部分的融合蛋白：

a)人因子IX(FIX)以及

b)人白蛋白，

用于在预防性给药方案中预防受试者内出血的方法中，其中所述FIX通过肽接头与人白蛋白的N-末端连接，所述肽接头可被参与凝血或被凝血酶激活的蛋白酶裂解，并且其中将以约90-110IU/kg的剂量向所述受试者施用所述融合蛋白质，给药间隔为每19至23天一次。

2.如权利要求1所述使用的融合蛋白，其中所述给药间隔是每21天一次。

3.如权利要求1或权利要求2所述使用的融合蛋白，其中将静脉内施用所述剂量。

4.如权利要求1至3中任一项所述使用的融合蛋白，其中所述剂量为约100IU/kg。

5.如前述权利要求中任一项所述使用的融合蛋白，其中年度化出血率少于每年20次。

6.如权利要求5所述使用的融合蛋白，其中所述年度化出血率少于每年3次。

7.如前述权利要求中任一项所述使用的融合蛋白，其中所述年度化自发性出血率少于每年15次。

8.如权利要求7所述使用的融合蛋白，其所述年度化自发性出血率少于每年2次。

9.如前述权利要求中任一项所使用的融合蛋白，其中在整个给药间隔中，所述FIX的血浆水平维持高于基线的至少约1％、至少约2％、至少约3％、至少约4％或5％至15％的谷水平。

10.如权利要求9所述使用的融合蛋白，其中在整个给药间隔中，所述FIX的血浆水平维持高于基线至少约2％至4％的谷水平。

11.如前述权利要求中任一项所述使用的融合蛋白，其中所述接头可被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)裂解。

12.如权利要求11所述使用的融合蛋白，其中所述接头包含选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的序列。

13.如前述权利要求中任一项所述使用的融合蛋白，其中所述融合蛋白的序列与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少70％的同一性。

14.如权利要求13所述使用的融合蛋白，其中所述融合蛋白的序列具有SEQ ID NO:1所示的序列。

15.如前述权利要求中任一项所述使用的融合蛋白，其中所述受试者是人。

16.如权利要求15所述使用的融合蛋白，其中所述人患有B型血友病。

17.如前述权利要求中任一项所述使用的融合蛋白，其中以约100至400IU/ml的浓度提供所述融合蛋白以供施用。

18.一种在预防性给药方案中预防受试者出血的方法，其包括以每19至23天一次的给药间隔向所述受试者施用约90-110IU/kg的剂量的融合蛋白，所述融合蛋白包含：

a)人因子IX(FIX)，以及

b)人白蛋白，

其中所述FIX通过可被参与凝血或被凝血酶激活的蛋白酶裂解的肽接头与人白蛋白的N端连接。

19.如权利要求18所述的方法，其中所述给药间隔是每21天一次。

20.如权利要求18或权利要求19所述的方法,其中静脉内施用所述剂量。

21.如权利要求18至20中任一项所述的方法,其中所述剂量为约100IU/kg。

22.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述年度化出血率少于每年20次。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述年度化出血率少于每年3次。

24.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述年度化自发性出血率少于每年15次。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述年度化自发性出血率少于每年2次。

26.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在整个给药间隔中,所述FIX的血浆水平维持高于基线至少约1%、至少约2%、至少约3%、至少约4%或或5%至15%的谷水平。

27.如权利要求26所述的方法,其中在整个给药间隔中,所述FIX的血浆水平维持高于基线至少约2%至4%的谷水平。

28.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述接头可被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)裂解。

29.如权利要求28所述的方法,其中所述接头包含选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的序列。

30.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述融合蛋白的序列与SEQ ID NO:1所示序列具有至少70%的同一性。

31.如权利要求30所述的方法,其中所述融合蛋白的序列具有SEQ ID NO:1所示的序列。

32.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述人患有B型血友病。

34.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中以约100至400IU/ml的浓度提供所述融合蛋白以供施用。

用于预防性治疗血友病的包含因子IX和人白蛋白的融合蛋白的21天给药方案及其方法

发明领域

[0001] 本发明涉及预防性给药方案,其中以约三周(例如,21天)的给药间隔使用约90-110IU/kg的长效因子IX(人FIX-人白蛋白)。

[0002] 发明背景

[0003] B型血友病是由缺乏凝血因子IX(FIX)(一种血液凝固过程的核心凝血因子)引起的X连锁隐性遗传性出血性疾病。B型血友病的体征和症状是可变的,这取决FIX缺乏症的严重程度和出血部位。大多数情况下,出血的特征在于自发性或创伤诱导的关节、肌肉和软组织内出血。在同一位置反复出血可能会导致关节的永久损伤。罕见但危及生命的出血也可能发生在中枢神经系统、喉咙或胃肠道。

[0004] B型血友病的治疗目标是治疗或预防出血,从而减少致残的关节和组织损伤,并改善生活质量(QoL)。FIX替代疗法可暂时纠正因子缺乏症并减少出血倾向。当前,源自血浆的和重组的FIX产品用于B型血友病的预防性和按需治疗。然而,源自血浆的产品存在和传染性病毒(诸如人免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)的传播相关的风险。源自血浆的和重组的FIX产品的半衰期都很短,因此需要每周2至3次给药,以显著减少出血发作。另外,可能需要重复给药以在施用后控制具有相对短的无出血期的出血发作。源自血浆的FIX或重组FIX产品需要频繁静脉内(IV)注射,这给患者及治疗其病症的医生带来了沉重负担。对于年幼的孩子,这种治疗方案经常(但并非总是)需要插入静脉介入装置,该装置必须保持极端清洁,以避免感染性并发症以及防止在管线中形成凝块。与此类装置相关的风险和发病可能会阻止一些非常年幼的血友病儿童接受足够的护理。

[0005] 已经产生了聚乙二醇化形式的FIX,其在小型猪和狗中显示FIX半衰期延长5至7倍(Østergaard,H等,2011.Blood.118(8):2333-2341)。在患者中观察到了相似的结果(Negrier C等Blood.2011 Sep 8;118(10):2695-701)。包含重组FIX和白蛋白(rIX-FP)的融合蛋白已在大鼠、兔和FIX缺陷小鼠中证明了其具有改善的PK参数(即,与目前市场上销售的重组FIX产品(例如,rFIX)相比有提高的恢复率、终末半衰期和浓度-时间曲线下面积[AUC])(Metzner HJ等,2009.ThrombHaemost.102:634-644)。对人的研究表明,与以前的FIX产品相比,每周以较少的输注次数预防性施用rIX-FP减少了FIX的消耗(Martinowitz等,ISTH,Amsterdam,The Netherlands,2013年6月29日至7月4日摘要)。

[0006] 这种包含FIX的融合蛋白的另一个实例是rFIX-Fc。在WO2012/006624中,描述了包含FIX的治疗性嵌合多肽,其可以与FcRn结合伴侣诸如Fc或白蛋白融合。rFIX-Fc显示延长的体内半衰期。该文件建议以每周20IU/kg、每10天40IU/kg或每两周120IU/kg的剂量施用rFIXFc以进行预防性治疗。Luk等(2011.Haemophilia.17:352-380)还描述了与BeneFIX®(即,rFIX)相比,rFIX-Fc显示出半衰期以及其他PK参数的增加。最近公布了rFIX-Fc的3期研究,该研究表明,当以每周一次的间隔由50IU/kg开始或以10天的给药间隔由100IU/kg开始施用时,B型血友病患者中年度化出血率(annualized bleeding rate)很低(Powell JS等,Dec 12,2013.NEJM.369:2313-23)。

[0007] WO2015/095925描述了包含因子IX的融合蛋白以各种剂量(25-250IU/kg)和从每天一次至每月一次的剂量间隔预防性治疗血友病。提供了每周预防(25-35IU/kg)的ABR数据,并报告了接受100IU/kg的5名血友病患者在21天内的FIX活性水平。该方案在100IU/kg rIX-FP注射后第21天显示FIX活性至少为4.1%。以100IU/kg21天给药间隔模拟PK结果。Zhang等(2016),Journal of Thrombosis and Haemostasis.14:2132-2140)描述了延长的rIX-FP半衰期,并且其群体PK模型支持间隔长达2周的延长的rIX-FP给药。

[0008] 本发明提供了利用长效因子IX的预防性给药方案,所述长效因子IX是包含人因子IX(FIX)和人白蛋白的融合蛋白,其中所述FIX通过可被蛋白酶(其参与凝血或被凝血酶激活)裂解的肽接头与人白蛋白的N-末端连接,并且其中以约90-110IU/kg的剂量向受试者施用所述融合蛋白,给药间隔约为21天。

[0009] 白蛋白可以增加人FIX的半衰期,但如果没有可裂解的接头,则FIX通常具有降低的活性或低的活性。可裂解的接头使得该多肽从由白蛋白引起的任何损害活性的空间位阻中释放出来,从而允许产生保留了FIX的高摩尔比活性的融合蛋白。与它们的不可裂解的对应物相比,此类融合蛋白表现出改善的半衰期和摩尔比活性。当被参与凝血的蛋白质裂解时,这使非激活的FIX具有延长的半衰期,直至发生出血事件为止,同时使FIX激活并从白蛋白裂解。从其与白蛋白的融合中释放出来的激活的FIX既具有高活性,又由于白蛋白的损失而迅速从血液中清除。

[0010] 现有技术描述了具有不可切割的接头的包含FIX和白蛋白的融合蛋白。例如,WO2001/79271描述了多种不同的治疗性多肽的融合多肽,所述治疗性多肽与人血清白蛋白融合时,预测在体内具有延长的功能性半衰期和延长的贮存期限。作为实例提及的治疗性多肽的列表中有因子IX。还描述了FIX的融合物,其中在白蛋白与FIX之间存在肽接头,但该接头未被指明是可裂解的。Sheffield等((2004),Br.J.Haematol.126:565-573)表达了由鼠FIX、8个氨基酸的接头(GPG$_4$TM)、鼠白蛋白和22个氨基酸的肽标签组成的鼠IX因子白蛋白融合蛋白,以及还有由人因子IX、7个氨基酸(G$_6$V)的接头和人白蛋白组成的因子IX白蛋白融合蛋白。Sheffield在FIX和白蛋白之间没有使用或建议使用可裂解的接头这些融合蛋白允许FIX被激活,但由于白蛋白的存在,其活性较低。

[0011] 一旦在凝血期间通过酶原(如FIX)的蛋白水解裂解或通过已被蛋白水解的"预"激活因子与第二多肽(如与组织因子结合的FVIIa)接触激活了凝血因子,就不再需要维持现在激活的凝血因子的长半衰期,因为这可能导致血栓形成并发症,如果激活因子的半衰期延长,这应该更加相关。因此,本发明的目的是提供适合于治疗期约为21天的预防性治疗的长寿命人FIX。

[0012] 具有SEQ ID NO:1所示序列的rIX-FP(重组人FIX-人白蛋白融合蛋白)(见图1)显示出改善的PK参数。具体而言,其在血浆中具有延长的循环,如与rFIX(例如,Benefix®)相比半衰期($t_{1/2}$)延长至5.3倍、CL降低至1/7、AUC增大至7倍(Santagostino E等,Blood.2012Sep 20;120(12):2405-11)。这令人惊讶地使得对血友病的预防性治疗的给药间隔比现有技术所证明的FIX融合蛋白的显著更长。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及包含以下部分的融合蛋白:

[0015] a)人IX因子(FIX)部分,以及

[0016] b)人白蛋白

[0017] 用于在预防性给药方案中预防受试者出血的方法,其中所述FIX通过肽接头与人白蛋白的N-末端连接,所述肽接头可被参与凝血的蛋白酶裂解或被凝血酶激活,并且其中以约90-110IU/kg的剂量向受试者施用所述融合蛋白质,给药间隔为每19至23天一次。在一个优选实施方案中,给药间隔是每21天一次。优选静脉内施用该剂量。在高度优选的实施方案中,剂量为约100IU/kg。

[0018] 在这些实施方案中的任一个中,给药间隔是每19至23天一次,优选约每21天一次。或者,给药间隔是每26-30天一次,优选约每28天一次(即,每月一次)。

[0019] 在一些实施方案中,长效人FIX的所述预防性给药方案可导致每年少于20次,每年少于15次,每年少于10次,每年少于9次,每年少于8次,每年少于7次,每年少于6次,每年少于5次,每年少于4次或每年少于3次的年度化出血率。

[0020] 在一个优选实施方案中,长效人FIX的所述预防性给药方案导致年度化出血率每年少于20次,最优选每年少于3次。

[0021] 在一些实施方案中,人长效FIX的所述预防性给药方案可导致年度化自发出血率为每年少于15次,每年少于12次,每年少于10次,每年少于9次,每年少于8次,每年少于7次,每年少于6次,每年少于5次,每年少于4次,每年少于3次或每年少于2次。

[0022] 在一个高度优选实施方案中,长效人FIX的所述预防性给药方案导致年度化自发出血率为每年少于15次,最优选每年少于2次。

[0023] 对于本发明的任何实施方案,在整个给药间隔中,FIX的血浆水平维持高于基线至少约1%的谷水平。优选地,在整个给药间隔中,FIX的血浆水平维持高于基线至少约2-5%的谷水平,并且更优选地,在整个给药间隔中,维持高于基线至少约2%、3%、4%或5%的谷水平。在其他更优选实施方案中,在整个给药间隔中,FIX的血浆水平维持高于基线4%至15%之间或5%至15%之间。

[0024] 所述融合蛋白具有可被激活凝血因子的蛋白酶裂解的接头,从而确保接头的裂解与发生凝血的部位处凝血因子的激活相关联。根据本发明,其他优选融合蛋白是其中一旦作为融合蛋白一部分的凝血因子被激活,就会裂解接头,从而还确保了融合蛋白的裂解与凝血事件相关联的那些融合蛋白。根据本发明的其他优选融合蛋白是其中该接头可被蛋白酶切割的那些融合蛋白,所述蛋白酶本身被作为融合蛋白一部分的凝血因子的活性直接或间接地激活,从而也确保了融合蛋白的裂解与凝血事件相关联。

[0025] 在一个优选实施方案中,接头可被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)裂解。

[0026] 在一个特别优选的实施方案中,接头包含选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的序列:

SEQ ID NO: 2

Pro	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val
1				5				10				15					

[0027]

SEQ ID NO: 3

Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val
1				5				10				15						

[0028] 在一个替代实施方案中,所述接头与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有90%的

同一性。在另一个实施方案中，所述接头与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有80％的同一性。在另一个实施方案中，其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有70％的同一性。在另一个实施例中，其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有60％的同一性。在另一个实施方案中，其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有50％的同一性。

[0029] 优选地，本发明的融合蛋白具有SEQ ID NO:1所示的序列(参见图1)。或者，融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少70％的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少75％的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80％的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少85％的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少90％的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少95％的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少98％的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少99％的同一性。

[0030] 为了本发明的目的，要施用融合蛋白的优选受试者是人。特别优选的是患有B型血友病的人。

[0031] 对于本发明的任何实施方案，优选以约100至400IU/ml，优选约100IU/ml、200IU/ml或400IU/ml的浓度提供所述融合蛋白以供施用。还可以以600IU/ml或1200IU/ml的浓度提供所述融合蛋白以供施用。

[0032] 本发明涉及在预防性给药方案中预防受试者出血的方法，其包括以每19至23天一次的给药间隔向所述受试者施用剂量为约90-110IU/kg的融合蛋白，所述融合蛋白包含：

[0033] a)人IX因子(FIX)部分，以及

[0034] b)人白蛋白，

[0035] 其中FIX通过可被参与凝血或被凝血酶激活的蛋白酶裂解的肽接头与人白蛋白的N端连接。在一个优选实施方案中，给药间隔是每21天一次。优选地静脉内施用剂量。在一个高度优选的实施方案中，剂量为约100IU/kg。

[0036] 在本发明的方法中，给药间隔是每19至23天一次，优选约每21天一次。或者，给药间隔是每26-30天一次，优选约每28天一次(即每月一次)。

[0037] 在一些实施方案中，长效人FIX的所述预防性给药方案可导致年度化出血率为每年少于20次，每年少于15次，每年少于10次，每年少于9次，每年少于8次，每年少于7次，每年少于6次，每年少于5次，每年少于4次或每年少于3次。

[0038] 在一个优选实施方案中，长效人FIX的所述预防性给药方案导致年度化出血率为每年少于20次，最优选每年少于3次。

[0039] 在一些实施方案中，长效人FIX的所述预防性给药方案可导致年度化自发性出血率为每年少于15次，每年少于12次，每年少于10次，每年少于9次，每年少于8次，每年少于7次，每年少于6次，每年少于5次，每年少于4次，每年少于3次或每年少于2次。

[0040] 在一个高度优选的实施方案中，长效人FIX的所述预防性给药方案导致年度化自发性出血率为每年少于15次，最优选每年少于2次。

[0041] 对于本发明的方法，在整个给药间隔中，FIX的血浆水平维持高于基线至少约1％的谷水平。优选地，在整个给药间隔中，FIX的血浆水平维持高于基线至少约2-5％的谷水平，并且更优选地，在整个给药间隔中，维持高于基线至少约2％、3％、4％或5％的谷水平。

在其他更优选实施方案中,在整个给药间隔中,FIX的血浆水平维持高于基线4%至15%或5%至15%。

[0042] 在本发明的方法中,接头可被激活凝血因子的蛋白酶裂解,从而确保接头的裂解与发生凝血的部位处凝血因子的激活相关联。根据本发明,其他优选融合蛋白是其中一旦作为融合蛋白一部分的凝血因子被激活就会裂解接头,从而还确保了融合蛋白的裂解与凝血事件相关联的那些融合蛋白。根据本发明的其他优选融合蛋白是其中该接头可被蛋白酶切割的那些融合蛋白,所述蛋白酶本身被作为融合蛋白一部分的凝血因子的活性直接或间接地激活,从而也确保了融合蛋白的裂解与凝血事件相关联。

[0043] 在一个优选实施方案中,接头可被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)裂解。

[0044] 在一个特别优选的实施方案中,接头包含选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的序列:

SEQ ID NO: 2

Pro Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val

1 5 10 15

[0045]

SEQ ID NO: 3

Pro Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val

1 5 10 15

[0046] 在一个替代实施方案中,所述接头与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有90%的同一性。在另一个实施方案中,其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有80%的同一性。在另一个实施方案中,其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有70%的同一性。在另一个实施例中,其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有60%的同一性。在另一个实施方案中,其与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之一具有50%的同一性。

[0047] 优选地,本发明的方法施用具有SEQ ID NO:1所示的序列(参见图1)。或者,所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少70%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少75%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少85%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少90%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少95%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少98%的同一性。所述融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少99%的同一性。

[0048] 对于本发明的方法,要施用融合蛋白的优选受试者是人。特别优选的是患有B型血友病的人。

[0049] 对于本发明的任何方法,优选以约100至400IU/ml,优选约100IU/ml、200IU/ml或400IU/ml的浓度施用所述融合蛋白。还可以以600IU/ml或1200IU/ml的浓度施用所述融合蛋白。

[0050] 发明详述

[0051] 如本文中所用,“预防性治疗”意指在一段时间内以多剂向受试者施用因子IX融合蛋白以升高受试者血浆中因子IX活性的水平。优选地,升高的水平足以降低自发性出血的发生率或在意外伤害的情况下防止出血。预防性治疗可减少或预防出血发作,例如在按需

治疗下所述的那些。预防性治疗可以是固定的，也可以是个体化的(如在“给药间隔”下所论述的)，例如，以补偿患者间的差异。

[0052] 如本文中所用，“给药间隔”意指在向受试者施用的多个药剂之间经过的时间量。在本发明的方法中使用嵌合人FIX-人白蛋白例如FIX-FP的给药间隔的长度可以为等量(以IU/kg计)的没有人白蛋白的所述因子IX(即，由所述FIX组成的多肽)所需的给药间隔的长度的1.5至8倍。当施用例如本发明的人因子IX-人白蛋白融合蛋白时，给药间隔的长度可为等量的没有人白蛋白的所述人因子IX所需剂量间隔的长度的至少长约1.5倍至8倍。给药间隔的长度可为等量的没有白蛋白的所述人因子IX(或由所述因子IX组成的多肽)所需的给药间隔的长度的至少约1.5至8倍。

[0053] 如本文中所用，“中值剂量”意指一半的研究受试者使用高于该剂量，并且一半的研究受试者使用低于该剂量。“平均剂量”意指平均的剂量(通过将所有剂量相加并除以剂量总数来计算)。对于约每21天一次、约每28天一次或约每月一次的给药间隔，“约”表示加减2天。

[0054] “年度化出血率”意指受试者在一年的过程中计算出的出血事件总数(出血发作次数)/(观察的目标治疗期)*365.25)。“年度化自发性出血率”意指受试者在一年的过程中计算出的自发性出血事件的数量(自发性出血发作次数)/(观察的目标治疗期)*365.25)。

[0055] “将FIX的血浆水平维持在至少约某一百分比的谷水平”意指在需要FIX的患者的某一给药方案期间，血浆中的FIX生物学活性将不会低于所述百分比水平，其中100％的所述FIX生物活性对应于1U/ml，其为正常人血浆中FIX活性的浓度，并且其中所述FIX生物活性优选地使用如实施例中所述的经过验证的一阶段凝血方法确定。

[0056] “谷水平”是在需要FIX的患者的治疗期间整个给药方案中所述FIX生物活性的最低水平。由于患者间的可变性，谷水平通常指中值，这意味着一半的研究受试者具有更高的谷水平，而一半的研究受试者具有更低的谷水平。尽管使用中值更为常见，但也可以将来自PK数据的谷水平计算为平均值，其已通过将所有患者的值相加并除以患者数来确定。

[0057] “基线”是指给定患者中的FIX活性水平，优先以占健康人的FIX活性(其被定义为100IU/dL或100％)的IU/dL或百分比表示。在重度B型血友病中，给定患者的基线水平非常低，达到零或几乎为零，而在轻度血友病中，患者的基线可以更高些，诸如为健康人中的FIX活性浓度的高于1％，高于2％或高于3％或高于4％或高于5％。当根据本发明施用包含i)人因子IX(FIX)部分和ii)人白蛋白的融合蛋白时，首先，FIX活性浓度急剧增加并且被缓慢清除，即其回到个体基线水平。特别是在重度B型血友病患者中，必须注意FIX活性浓度不得降到低于最低水平，以防止出血。该最低水平称为谷水平。在重度B型血友病患者中，当基线实际为零时，高于基线1％的谷水平意指FIX活性浓度约为健康人中的FIX活性浓度的1％。在具有健康人中FIX活性浓度的3％FIX活性的基线水平的轻度B型血友病患者中，高于基线1％的谷水平意指FIX活性浓度约为健康人中FIX活性浓度的4％。

[0058] 在本发明中，给药间隔是每21天一次(即，每19至23天一次)。最优选的给药间隔是三周(21天)。或者，给药间隔是每26-30天一次，优选约每28天一次(即每月一次)。

[0059] 给药间隔可替代地是基于药代动力学数据或关于该受试者的其他信息而为每个受试者确定的个体化间隔。个体化的剂量/给药间隔组合可以与前面段落中的固定间隔方案相同或不同。该方案最初可以是固定的给药间隔，然后其可更改为个性化的给药间隔。该

方案最初可以是固定剂量(IU/kg)和给药间隔，然后其可更改为个性化给药间隔和固定剂量。该方案最初也可以是固定的给药间隔和剂量(IU/kg)，然后其可更改为个体化剂量和固定给药间隔。

[0060] 可用于本发明方法的治疗性剂量为约90-110IU/kg、约90-95IU/kg、约95-100IU/kg、约100-105IU/kg和约105-110IU/kg。可以使用的其他治疗剂量是110-115IU/kg、约115-120IU/kg、约120-125IU/kg、约125-130IU/kg、约130-135IU/kg、约135-140IU/kg、约140-145IU/kg和约145-150IU/kg。

[0061] 本发明涵盖如下剂量：约90-110IU/kg、约90-105IU/kg、约90-100IU/kg、约90-95IU/kg、约95-110IU/kg、约95-105IU/kg、约95-100IU/kg、约100-110IU/kg、约100-105IU/kg、约105-110IU/kg、约90IU/kg、约95IU/kg、约100IU/kg、约105IU/kg或约110IU/kg。可以使用的其他治疗剂量是115IU/kg、约120IU/kg、约125IU/kg、约130IU/kg、约135IU/kg、约140IU/kg、约145IU/kg和约150IU/kg。在一个高度优选的实施方案中，剂量为约100IU/kg，最优选为100IU/kg。

[0062] 优选剂量和给药间隔为：约每3周一次约90-110IU/kg、约每三周一次约90-105IU/kg、约每三周一次约90-100IU/kg、约每3周一次约90-95IU/kg、约每3周一次约95-110IU/kg、约每3周一次约95-105IU/kg、约每3周一次约95-100IU/kg、约每三周一次约100-110IU/kg、约每三周一次约100-105IU/kg、约每三周一次约105-110IU/kg、约每三周一次约90IU/kg、约每3周一次约95IU/kg，约每3周一次约100IU/kg，约每3周一次约105IU/kg，约每3周一次约110IU/kg。“约每三周或更长时间一次”包括约每19至23天一次，以及约每20至22天一次，优选约每21天一次。最优选的剂量和给药间隔为每3周(21天)一次100IU/kg。现有技术尚未公开三周给药间隔的临床疗效。

[0063] 其他优选剂量和给药间隔为：约每28天一次约90-150IU/kg、约每28天一次约90-110IU/kg、约每28天一次约90-105IU/kg、约每28天一次约90-100IU/kg、约每28天一次约90-95IU/kg、约每28天一次约95-110IU/kg、约每28天一次约95-105IU/kg、约每28天一次约95-100IU/kg、约每28天一次约100-110IU/kg、约每28天一次约100-105IU/kg、约每28天一次约105-110IU/kg、约每28天一次约110-115IU/kg、约每28天一次约115-120IU/kg、约每28天一次约120-125IU/kg、约每28天一次约125-130IU/kg、约每28天一次约130-135IU/kg、约每28天一次约135-140IU/kg、约每28一次天约140-145IU/kg、约每28天一次约145-150IU/kg、约每28天一次约90IU/kg、约每28天一次约95IU/kg、约每28天一次约100IU/kg、约每28天一次约105IU/kg、每28天一次约110IU/kg、约每28天一次约115IU/kg、每28天一次约120IU/kg、约每28天一次约125IU/kg、约每28天一次约130IU/kg、约每28天一次约135IU/kg、约每28天一次约140IU/kg、约每28天一次约145IU/kg和约每28天一次约150IU/kg。

[0064] “约每28天或更长时间一次”包括约每26到30天一次，以及约每27至29天一次，优选约每28天一次。高度优选的剂量和给药间隔为每28天(即一个月)一次100IU/kg。

[0065] 在本发明中包括这样的实施方案，其中在施用100IU/kg rIX-FP剂量后的21天整个给药间隔中，FIX活性的中值血浆水平维持高于基线至少约5％的谷水平。本发明还包括这样的实施方案，其中每21天施用100IU/kg rIX-FP剂量，在整个给药间隔中，FIX活性的中值血浆水平维持高于基线至少约4％的谷水平。或者，可以将FIX活性的血浆水平计算为平均值。

[0066] 在本发明中还包括这样的实施方案，其中在施用100IU/kgrIX-FP剂量后28天的整个给药间隔中，FIX活性的中值血浆维持高于基线至少约5％、4％、3％或2％的谷水平。本发明还包括这样的实施方案，其中每28天施用100IU/kg rIX-FP剂量，在整个给药间隔中，FIX活性的中值血浆水平维持高于基线至少约1％的谷水平。或者，可将FIX活性的血浆水平计算为平均值。

[0067] 特别地，本发明提供了用于包含FIX和人白蛋白的融合蛋白的预防性给药方案，其中因子IX(FIX)部分通过可被参与凝血或被凝血酶激活的蛋白酶裂解的肽接头与人白蛋白连接。

[0068] 接头允许在激活FIX之前裂解。由于人白蛋白，rFIX-FP融合蛋白显示出延长的FIX半衰期，但是由于裂解是在出血事件之前发生的，因此激活的FIX的半衰期在激活前会缩短。

[0069] 在本发明的意义上，以凝血相关模式进行的蛋白水解裂解是由于至少一种凝血因子或凝血辅因子的激活而发生的任何蛋白水解裂解。凝血因子的激活几乎与接头肽的蛋白水解裂解并行(见图1)。激活可以例如通过凝血因子的蛋白水解裂解或通过与辅因子结合而发生。白蛋白会增加FIX在血液中的半衰期，直至发生出血事件为止，该出血事件会同时激活FIX并将其从白蛋白上裂解下来。所述裂解使多肽从由白蛋白引起的任何损害活性的空间位阻中释放出来，从而允许融合蛋白的产生，所述融合蛋白保留了FIX的高摩尔比活性。然后由于白蛋白的失去，裂解的FIX被从血液中迅速清除。与它们的不可裂解的对应物相比，此类融合蛋白表现出改善的半衰期和增加的摩尔比活性。因此，与包含rIX的不可裂解的融合蛋白相比，需要更少的rIX-FP来提供治疗效果。

[0070] 根据本发明的优选融合蛋白是在至少一个凝血相关测定中具有与通过不可裂解的接头(其具有氨基酸序列GGGGGGV(SEQ ID NO:4))连接的治疗性融合蛋白的摩尔比活性相比增加至少25％的治疗性融合蛋白的摩尔比活性(特别是摩尔比凝血相关活性)的那些融合蛋白。更优选的是其中在可用的不同的凝血相关测定的至少一个中摩尔比活性增加至少50％的融合蛋白，甚至更优选其中摩尔比活性增加至少100％的那些融合蛋白。

[0071] 在另外一个实施方案中，接头肽包含不止一种蛋白酶的裂解位点。这可通过可在同一位置被不同的蛋白酶裂解的接头肽或通过提供两个或多个不同裂解位点的接头肽来实现。可能存在有利的情况，其中必须通过蛋白水解裂解来激活治疗性融合蛋白以实现酶促活性，并且其中不同的蛋白酶可有助于该激活步骤。FIX的激活可通过FXIa或FVIIa/组织因子(TF)来实现。在一个优选实施方案中，接头可被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)裂解。

[0072] 具有SEQ ID NO:1所示序列的rIX-FP(重组人FIX-人白蛋白融合蛋白)具有延长的血浆循环，如与rFIX(例如，Benefix®)相比半衰期($t_{1/2}$)延长至5.3倍、CL降低至1/7以及AUC增大至7倍所显示的。此外，当将rIX-FP的药代动力学参数与Alprolix™ FDA处方信息中的FIX-Fc的相应药代动力学数据进行比较时，与rIX-Fc(ALPROLIX™)相比，rIX-FP的AUC0-inf增加至约3.8倍、CL/BW降低至约10/37、增量回收率提高了约26％，分布体积降低至约10/32，药物的平均停留时间增加了约19％。

[0073] 预防是通过静脉内注射浓缩因子以预防预期的出血的治疗。从凝血因子水平>1IU/dl(>1％)的中度血友病患者很少经历自发性出血并且关节功能得到更好保护的观察设想了预防。因此，将FIX活性保持在1％以上以防止出血和关节破坏的预防应成为维持正

常肌肉骨骼功能的治疗目标(GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF HEMOPHILIA,第2版,由治疗指南工作组代表血友病联合会(WFH)准备的)。单剂量的rIX-FP能够将FIX活性维持在1％以上并持续14天或更长时间。

[0074] 注射频率的降低减少了感染的风险,患者的不适感以及需要就医的次数。这些有利方面将积极影响患者的依从性以及血友病的预防性治疗的有效性。

[0075] 人FIX

[0076] 人FIX(维生素K依赖多肽组中的一个成员)是分子量为57kDa的单链糖蛋白,其由肝细胞作为415个氨基酸的无活性酶原分泌到血流中。其含有位于多肽N末端Gla结构域中的12个β-羧基-谷氨酸残基。Gla残留物需要维生素K才能进行生物合成。在Gla结构域之后,有两个表皮生长因子结构域(激活肽结构域和胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶结构域)。FIX的其他翻译后修饰包括羟基化(Asp 64)、N-(Asn157和Asn167)以及O型糖基化(Ser53、Ser61、Thr159、Thr169和Thr172)、硫酸化(Tyr155)和磷酸化(Ser158)。

[0077] 通过激活肽在Arg145-Ala146和Arg180-Val181处的蛋白水解从而形成通过一个二硫桥保持在一起的两个多肽链(N末端轻链(18kDa)和C末端重链链(28kDa)),FIX被转化为其活性形式因子IXa。因子IX的激活裂解可以例如通过因子XIa或因子VIIa/TF在体外实现。IX因子以5-10μg/ml的浓度存在于人血浆中。发现因子IX在人中的血浆终末半衰期为约15至18小时(White GC等1997.Recombinant Factor IX.ThrombHaemost.78:261-265;Ewenstein BM等2002.Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant F IX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B.Transfusion 42:190-197)。

[0078] 增强半衰期的白蛋白术语“人血清白蛋白”(HSA)和“人白蛋白”(HA)在本申请中可互换使用。术语“白蛋白”和“血清白蛋白”更宽泛,并且涵盖人血清白蛋白(及其片段和变体)以及来自其他物种的白蛋白(及其片段和变体)。

[0079] 如本文中所用,“白蛋白”统指白蛋白多肽或氨基酸序列,或具有白蛋白的一种或多种功能活性(例如,生物活性)的白蛋白片段或变体。特别地,“白蛋白”是指人白蛋白或其片段,特别是人白蛋白的成熟形式。例如,白蛋白可具有如US2008260755A1(其通过引用整体并入本文)中所述的序列或其变体。白蛋白融合蛋白的白蛋白部分可包含HA序列的全长,或者可包含一个或多个能够稳定或延长治疗活性的其片段。此类片段的长度可以是10个或更多个氨基酸,或者可包括来自HA序列的约15、20、25、30、50或更多个连续的氨基酸,或者可包括HA的特定结构域的一部分或全部。

[0080] 本发明的融合蛋白的人白蛋白部分可以是天然或人工的正常HA的变体。本发明融合蛋白的治疗性多肽部分也可以是本文所述的相应治疗性多肽的变体。术语“变体”包括天然或人工的保守或非保守的插入、缺失和取代,其中此类改变基本上不改变赋予治疗性多肽的治疗活性的活性部位或活性结构域,如在US2008260755A1(其通过引用整体并入本文)中所描述的。

[0081] 本发明具体地涉及融合蛋白,其包含将凝血因子或其片段或变体与人白蛋白的N-末端连接,使得在治疗性多肽与人白蛋白之间引入居间可裂解的肽接头,使得形成的融合蛋白与未与人白蛋白相连的凝血因子相比具有延长的体内半衰期,并且在可用的不同凝血相关测定的至少一个中,与具有不可裂解接头的相应融合蛋白相比,该融合蛋白具有高至

少25％的摩尔比活性。

[0082] 上述定义中的“因子IX”包括具有包括任何天然多态性的天然氨基酸序列的多肽。其还包括具有稍微修饰的氨基酸序列(例如,包括末端氨基酸的缺失或添加在内的经修饰的N-末端或C-末端)的多肽,只要那些多肽基本上保留各自治疗性多肽的活性即可。所包括的变体与野生型序列在一个或多个氨基酸残基上不同。此类差异的实例可包括N-和/或C-末端有一个或多个氨基酸残基(例如优选1至30个氨基酸残基)截短,或在N-和/或C-端添加一个或多个额外的残基,以及保守氨基酸取代,即在具有相似特征的氨基酸组内进行的取代,例如(1)小氨基酸,(2)酸性氨基酸,(3)极性氨基酸,(4)碱性氨基酸,(5)疏水氨基酸,和(6)芳香族氨基酸。下表中显示了此类保守取代的实例。

[0083] 表1:氨基酸的保守取代

[0084]

(1)	丙氨酸	甘氨酸		
(2)	天冬氨酸	谷氨酸		
(3a)	天冬酰胺	谷氨酰胺		
(3b)	丝氨酸	苏氨酸		
(4)	精氨酸	组氨酸	赖氨酸	

[0085]

(5)	异亮氨酸	亮氨酸	甲硫氨酸	缬氨酸
(6)	苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸	

[0086] 本发明的融合蛋白的体内半衰期(通常测定为终末半衰期或β-半衰期)通常比非融合多肽的体内半衰期长至少约25％,优选至少约50％,更优选100％以上。

[0087] 与没有可裂解接头的相应融合蛋白相比,本发明的融合蛋白的摩尔比活性增加至少25％,优选至少50％,更优选至少100％。

[0088] 就此而言,摩尔比活性(或特别是如本文所考虑的摩尔比凝血相关活性)被定义为每摩尔(或例如nmol)目标治疗性多肽或治疗性融合蛋白表达的活性。摩尔比活性的计算允许直接比较不同构建体的活性不受所研究多肽的不同分子量或光密度影响。摩尔比活性可以如下表2中针对FIX和FIX-FP融合蛋白所例示的那样进行计算。

[0089] 表2:如对于纯化的FIX-HSA融合蛋白所显示的摩尔比活性的计算

[0090]

产物	$OD_{(280nm,\ 1\%)}$	MW	活性 /Vol/OD_{280} (IU/L/OD_{280})	摩尔光密度 (1mol/L 下的 OD_{280})	摩尔比活性的计算 (IU/mol)
FIX	13.3 [1)]	57 000	针对产物所测定的	75810 (= MW x $OD_{(280,\ 1\%)}$/10)	= (活性 /Vol/OD_{280}) x (1mol/L 下的 OD_{280})
白蛋白	5.7 [2)]	66 300		37791 (= MW x $OD_{(280,\ 1\%)}$/10)	
FIX-FP			针对产物所测定的	113601 (=FIX 和白蛋白的摩尔光密度之和)	= (活性 /Vol/OD_{280}) x (1mol/L 下的 OD_{280})

[0091] 1)R.G.Di Scipio等,Biochem.16:6698-706(1977)

[0092] 2)C.Chaudhury等J.Exp.Med.197(3):315-322(2003)

[0093] 为了测定与摩尔比凝血相关活性,可使用测定与凝血过程相关的酶促活性或辅因子活性的任何测定法。

[0094] 因此,在本发明的意义上,“与凝血相关的测定”是测定在凝血过程中具相关性的酶促活性或辅因子活性或能够确定内在或外在凝血级联已经被激活的任何测定。因此,“凝血相关”测定可以是直接凝血测定如aPTT、PT或凝血酶生成测定。然而,还包括其他测定法,例如用于特定凝血因子的生色测定法。此类测定法或相应试剂的实例是具有相应凝血因子缺乏血浆(Dade Behring)的**Pathromtin®** SL(aPTT测定,Dade Behring)或**Thromborel®** S(凝血酶原时间测定,Dade Behring)、使用例如凝血因子缺陷型血浆的凝血酶生成测定试剂盒(Technoclone,凝血酶)、生色测定,如Biophen因子IX(HyphenBioMed)、**Staclot®** FVIIa-rTF(Roche Diagnostics GmbH)、**Coatest®** Factor VIII:C/4(Chromogenix)等。

[0095] 为了本发明的目的,以上测定或等同的凝血相关测定中的任何一种的增加被认为显示出摩尔比活性的增加。例如,25%的增加是指上述任一个测定或等效测定中有25%的增加。

[0096] 对于FIX,aPTT测定常用于测定凝血活性。然而,可使用其他凝血相关测定法或测定原理来测定FIX的摩尔比活性。

[0097] 尽管期望具有高体内回收率和非激活凝血因子的长半衰期,但在其激活或其辅因子激活后限制凝血因子的半衰期以避免血栓前风险是有利的。因此,在开始凝血过程后,应再次缩短活性凝血因子的半衰期。这可通过增强凝血相关模式的失活或消除凝血因子来实现。

[0098] 根据本发明的失活意指可以例如通过凝血因子和相应凝血因子的抑制剂的复合物形成或通过进一步的蛋白水解裂解(如例如在FVIII和FV的情况下是已知的)引起的治疗性多肽活性的降低。

[0099] 激活的治疗性融合蛋白的失活速率定义为活性下降的速率,例如通过与抑制剂反应或通过蛋白水解失活。失活速率可通过在生理量的该凝血因子抑制剂存在的情况下随时间推移跟踪激活的凝血因子的摩尔比活性来测量。

[0100] 或者,可以在向动物施用激活产物之后,在适当的时间范围内使用活性和抗原测

定法测试血浆样品，来测定失活速率。

[0101] 激活的治疗性融合蛋白的消除速率定义为多肽从人或动物的循环中消除的速率。消除速率可以通过在静脉内施用后测量激活的治疗性融合蛋白的药代动力学来测定。使用抗原测定，可以测定通过直接从循环中去除的消除。另外使用活性测定法，可以测定特定的去除和失活速率。

[0102] 根据本发明，FIX通过可被参与凝血或被凝血酶激活的蛋白酶切割的接头与人白蛋白的N-末端偶联。接头应该是非免疫原性的，并且应该具有足够柔性以允许被蛋白酶裂解。

[0103] 所述可裂解的接头优选包含源自下述的序列：

[0104] a)待施用的治疗性多肽本身，如果其包含在治疗性多肽的激活期间被蛋白水解裂解的蛋白水解裂解位点，

[0105] b)该治疗性多肽的底物多肽，或

[0106] c)被蛋白酶裂解的底物多肽，所述蛋白酶通过治疗性多肽的直接或间接参与而激活或形成。

[0107] 在一个更优选的实施方案中，接头区包含要应用的治疗性多肽的序列，其应当导致表达的融合蛋白的新抗原特性的风险降低。

[0108] 接头序列或者源自FIX的激活区域的序列，来自如FX或FVII的FIX任何底物的裂解区域，或者来自被FIXa参与其激活的蛋白酶裂解的任何底物多肽的裂解区域。

[0109] 在一个高度优选的实施方案中，接头肽源自FIX本身。在另一个优选实施方案中，接头肽源自FX或FVII。在另一个优选实施方案中，接头序列包含可被FXIa或FVIIa/TF(FIX的两个生理上相关的激活剂)切割的两个切割序列。

[0110] 只要所述接头仍可被裂解所述接头的一种或多种蛋白酶裂解，则所述接头的变体和片段也包括在本发明中。术语“变体”包括插入、缺失和取代(保守的或非保守的)。

[0111] 药物组合物和施用方式

[0112] 可将本发明的融合蛋白掺入适合于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含所述蛋白质和药学上可接受的载体。如本文中所用，“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体在Remington's Pharmaceutical Sciences(本领域的标准参考文献)的最新版本(其通过引用并入本文)中进行了描述。此类载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格(finger's)溶液、葡萄糖溶液和5％人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性载体诸如不挥发的油。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则考虑将其用于组合物中。还可将补充性的活性化合物掺入组合物中。

[0113] 将本发明的药物组合物配制成与其预期的给药途径相容。施用途径的实例包括肠胃外，例如静脉内、真皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮(局部)；经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或混悬剂可包括以下组分：无菌稀释剂，诸如注射用水、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌剂，诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，诸如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂，诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及调节张力的试剂，诸如氯化钠或葡萄糖。可用酸或

碱诸如盐酸或氢氧化钠调节pH。可将肠胃外制剂封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。静脉注射施用是优选施用途径。

[0114] 适用于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(其是水可溶解时)或分散体,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,该组合物必须是无菌的,并且应该具有达到存在易于注射能力的程度的流动性。其必须在生产和储存条件下保持稳定,并且必须进行防腐处理以防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散体的情况下维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,来防止微生物的作用。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0115] 可通过以下方式制备无菌注射溶液:将所需量的活性化合物(例如,rIX-FP)连同上文列举的多种其它成分一起掺入适合的溶剂中,根据需要,随后过滤除菌。通常,通过将活性化合物掺入到无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物包含基本分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述方法从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

[0116] 用于注射的制剂可包含治疗有效量的因子IX(FIX)融合蛋白(例如,rFIX-FP),该量可以由技术人员确定。特别地,因子IX(FIX)融合蛋白(例如,rFIX-FP)可以以约100至400IU/ml的浓度施用。例如,可以以约100IU/ml、200IU/ml或400IU/ml的浓度提供融合蛋白以供施用。可以以更高的浓度诸如600IU/ml和1200IU/ml提供融合蛋白以供施用。

[0117] 以剂量单位形式配制药物组合物,诸如注射用组合物,以易于施用和剂量均匀是特别有利的。如本文中所用,剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位包含经计算可产生所需的治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药物载体。剂量单位形式的规范由活性化合物的独特特性和要实现的特定治疗效果决定,并直接取决于其。

[0118] 可将药物组合物与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。

附图说明

[0119] 图1:成熟rIX-FP的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。FIX示于aa 1-416中,接头序列以粗体和下划线(aa 416-433)标示,白蛋白序列示于aa434-1018中。

[0120] 现在已经详细描述了本发明,通过参考以下实施例将更清楚地理解本发明,其包括在本文中仅出于说明的目的,而无意于限制本发明。本文提及的所有专利和出版物均明确地通过引用并入本文。

实施例

[0121] 实施例1-在患有B型血友病的受试者中利用重组凝血因子IX白蛋白融合蛋白(rIX-FP)进行的21天预防性给药方案的研究

[0122] 本研究旨在评估21天预防性方案用于施用rIX-FP(重组人FIX-人白蛋白融合蛋白)以预防出血事件的疗效,以及评估该给药间隔的安全性和药代动力学(PK)。

[0123] 使用rIX-FP 50-75IU/kg的14天预防性方案可有效预防B型血友病患者的出血事件,导致ABR为2.13(中值为0.92,Q1:Q3:0,3.19),AsBR值为1.19(中值为0,Q1:Q3:0,1.58)(n=48,平均持续时间为490天)。在这项研究中,研究了利用100IU/kg rIX-FP的21天给药间隔是否可以有效预防这些血友病患者的出血发作。

[0124] 患者

[0125] 所有患者均患有先天性因子IX(FIX)缺乏症(B型血友病)。先前接受rIX-FP的14天方案(48名患者)的11名患者被改为21天治疗方案。受试者每21天静脉内接受100IU/kg rIX-FP预防性治疗。在14天的方案下,这些患者的ABR值为0.47(中值:0,Q1:Q3,0,1),AsBR值为0.18(中值:0,Q1:Q3:0,0),并且已使用14天方案治疗了295天。在研究的积极治疗期间发生的所有出血事件均用rIX-FP治疗。所有受试者自己施用用于常规预防和治疗出血事件的rIX-FP治疗,并且治疗和出血事件由受试者记录在电子日记中。

[0126] 试验目标和终点

[0127] 这项研究的主要目的是评估利用rIX-FP的21天常规预防性施用方案在利用rIX-FP预防所治疗的出血方面的临床反应。

[0128] 分析方法

[0129] FIX活性使用经过验证的一阶段凝血方法进行测量。简而言之,将测试样品与等量的贫FIX血浆混合,并使用Pathromtin SL(Siemens Healthcare Diagnostics,Marburg)作为激活剂,通过体外测定激活部分凝血活酶时间(aPTT)来进行测试,使用贝林凝血系统(BCS)进行rIX-FP活性测定。使用参考曲线解释结果,所述参考曲线由制造商针对FIX的WHO标准(国际血液凝血因子II、VII、IX、X、人、血浆)校准的标准人血浆(SHPL)制备,结果为以规范或国际单位的百分比报告。

[0130] 通过根据Nijmegen修饰的Bethesda法(一种基于人柠檬酸化血浆中的aPTT体外测定的凝血测定法)滴定抑制剂。≥0.6Bethesda单位(BU)的结果定义为阳性结果。

[0131] FIX活性、FIX抗原、针对rIX-FP的抑制剂和抗体的分析在CSLBehring,Marburg,Germany的中央实验室进行。

[0132] 功效

[0133] 将达到止血的输注次数制成表格,以确定rIX-FP在治疗出血事件中的功效。另外,研究者在四点量表上对出血事件的治疗效果进行了评估,所述四点量表考虑了受试者的输注次数以及受试者报告的治疗后疼痛缓解。

[0134] 21天治疗方案的年度化自发性出血率是通过在完成至少12周治疗的情况下在21天治疗期期间需要治疗的自发性出血次数得出的。

[0135] 药品

[0136] rIX-FP是在CHO细胞中合成的分子量约为125,000Da的单链糖蛋白。生产和配制不包括添加来自动物或人来源的赋形剂(Metzner HJ,Weimer T,Kronthaler U等Genetic

fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of Factor IX.Thrombosis and Haemostasis 2009;102:634-44)。

[0137] rIX-FP是高度纯化的重组融合蛋白,其通过源自参与FIX激活的内源性FIX序列的短的可裂解接头将重组人凝血FIX与重组人白蛋白连接在一起。相同的酶,例如凝血因子XIa或凝血因子VIIa/组织因子(其在凝血过程中激活FIX)将接头从融合蛋白裂解,从而去除白蛋白部分。rIX-FP以冻干无菌制剂形式提供,旨在以500和1000IU/小瓶的单次使用小瓶进行IV注射,并用2.5mL无菌注射用水复原。

[0138] 结果

[0139] 剂量

[0140] 每21天给所有受试者静脉内注射100IU/kg预防剂量的rIX-FP,平均持续时间为429天(见表3)。这类似于以7、10和14天的给药间隔施用rIX-FP的时间长度。表3还显示了7天、10天和14天方案研究的rIX-FP施用的平均持续时间。

[0141] 表3:方案的出血发作的治疗期的持续时间(天)

[0142]

统计	7-天方案	10-天/每月 3 次方法	14-天方案	21-天方案
n	44	24	48	11
平均值(STD)	465.7 (255.22)	452.1 (312.95)	490.2 (246.40)	429.3 (216.91)
中值	459.0	449.0	518.5	491.0
Min, Max	42, 890	11, 875	86, 869	64, 693
Q1, Q3	224.5, 700.0	174.5, 756.5	252.5, 725.0	146.0, 586.0
总和	20489	10850	23531	4722

[0143] 功效

[0144] 21天方案导致平均ASBR和平均ABR值非常低。ABR为1.1(中值:0,Q1:Q3:0,2.1),AsBR为0.53(中值:0,Q1:Q3:0,0)(一名从14天转换为21天的受试者具有少于8周的持续时间,并且不使用出血率进行计算)。结果示于表4中。

[0145] 表4:按方案划分的AsBR和ABR

[0146]

	统计	7-天方案	10-天/每月3次的方案	14-天方案	21-天方案
总年度化出血率	n	42	21	48	10
	平均值(STD)	2.90 (3.009)	2.45 (2.801)	2.13 (2.887)	1.10 (1.628)
	中值	2.04	1.25	0.92	0.00
	Min, Max	0.0, 11.4	0.0, 10.4	0.0, 12.1	0.0, 4.7
	Q1, Q3	0.00, 4.66	0.43, 4.01	0.00, 3.19	0.00, 2.11
自发的年度化出血率	n	42	21	48	10
	平均值(STD)	1.31 (2.360)	0.87 (1.865)	1.19 (2.167)	0.53 (1.491)
	中值	0.00	0.00	0.00	0.00
	Min, Max	0.0, 11.4	0.0, 7.6	0.0, 10.4	0.0, 4.7
	Q1, Q3	0.00, 1.57	0.00, 0.83	0.00, 1.58	0.00, 0.00

[0147] 表5显示了每21天接受rIX-FP的患者之间的出血率变化。只有3名患者的ABR高于2,只有1名患者的AsBR高于1。除了受试者0020的出血率略高之外,结果高度一致,表明在21天施用方案中患者的出血率极低。

[0148] 表5:每21天接受rIX-FP的患者之间的个体出血率

[0149]

受试者ID	方案	年龄组	研究持续时间(天数)	总治疗持续时间(天数)	ABR	AsBR
1	21-天方案	>=12-65岁	772	385	4.7	4.7
2	21-天方案	>=12-65岁	784	487	0.0	0.0
3	21-天方案	>=12-65岁	793	491	0.0	0.0
4	21-天方案	>=12-65岁	786	526	0.0	0.0
5	21-天方案	>=12-65岁	860	586	0.0	0.0
6	21-天方案	>=12-65岁	759	146	2.5	
7	21-天方案	>=12-65岁	648	64		
8	21-天方案	>=12-65岁	886	693	2.1	0.0
9	21-天方案	>=12-65岁	874	547	0.0	0.0
10	21-天方案	>=12-65岁	840	652	1.7	0.6
11	21-天方案	>=12-65岁	632	145	0.0	0.0

[0150] 基于2017年3月结束时的数据截止(datacut)的更新结果

[0151] 83名患者已进入总体研究。

[0152] 表6:人口统计数据

[0153]

	≥12岁 n=59	<12岁 n=24	总计 N=83
年龄(岁数), 平均值(范围)	36.0 (13–63)	7.0 (2–11)	27.7 (2–63)
<18岁, n (%) ≥18岁, n (%)	5 (8.5) 54 (91.5)	24 (100) 0	29 (34.9) 54 (65.1)
人种, n (%) 白人 亚洲人 黑人	45 (76.3) 12 (20.3) 2 (3.4)	23 (95.8) 0 1 (4.2)	68 (81.8) 12 (14.5) 3 (3.6)
种族, n (%) 西班牙裔 非西班牙裔	0 59 (100)	2 (8.3) 22 (91.7)	2 (2.4) 81 (97.6)

[0154] 在扩展研究开始时,≥7岁的PTP的给药间隔为7天(n=19)、10天(n=13)或14天(n=27)。<12岁的PTP的给药间隔为7天(n=18)、10天(n=2)或14天(n=4)。

[0155] 在数据截止时,≥12岁的PTP的79%的给药间隔为10天(n=12)、14天(n=26)或21天(n=9)。

[0156] 在研究期间,11名≥18岁的PTP转变成21天方案,其中两个改回14天以减少出血频率。

[0157] 在数据截止时,25%的<12岁的PTP的给药间隔为10天(n=1)或14天;两名患者从14天方案改回10天(n=1)或7天(n=1)方案,并且两名患者从10天方案转变成7天方案以维持更低的出血率。

[0158] 计算每种给药方案的ABR和AsBR;分析包括扩展研究期间任何时间点接受每种方案的患者总数(表7)。

[0159] 表7:不同给药方案间的AsBR和ABR

[0160]

方案*		7天	10天	14天	21天
≥12岁 (n=59)		n=21	n=17	n=40	n=11
AsBR	中值 (Q1,Q3)	0.33 (0.00, 2.39)	0.00 (0.00, 0.68)	0.00 (0.00, 1.54)	0.00 (0.00, 0.45)
	平均值 (SD)	1.38 (1.91)	0.50 (0.90)	1.21 (2.28)	0.62 (1.42)
ABR	中值 (Q1,Q3)	1.43 (0.18, 4.36)	0.71 (0.00, 3.39)	0.73 (0.00, 2.62)	0.00 (0.00, 2.50)
	平均值 (SD)	2.49 (2.632)	1.68 (2.075)	1.95 (2.851)	1.18 (1.603)
<12岁 (n=24)		n=21	n=7	n=8	N/A
AsBR	中值 (Q1,Q3)	0.00 (0.00, 0.59)	0.00 (0.00, 3.06)	0.75 (0.00, 2.86)	N/A
	平均值 (SD)	0.73 (1.75)	1.52 (2.90)	1.53 (1.86)	N/A

[0161]

ABR	中值 (Q1,Q3)	2.31 (0.96, 4.21)	2.82 (0, 6.11)	3.11 (1.63, 5.77)	N/A
	平均值 (SD)	3.18 (3.259)	3.84 (3.843)	3.56 (2.650)	N/A

[0162] 讨论

[0163] 这项研究首次支持使用21天的给药间隔来预防出血发作,因为其对于预防B型血友病患者的出血发作非常有效。出血率极低,尤其是考虑到较长的给药间隔。由于静脉内施用rIX-FP的不便,较长的给药间隔是有利的并且对于患者而言更方便。这应增加患者的依从性,并导致更好地控制B型血友病患者的出血事件。

序列表

<110> CSL Behring Recombinant Facility AG

<120> 用于预防性治疗血友病的包含因子IX和人白蛋白的融合蛋白的21天给药方案及其方法

<130> 2017_L002_A276

<150> US Provisional Application 62/526377

<151> 2017-06-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1018

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白

<220>

<221> FIX

<222> (1)..(415)

<220>

<221> 接头

<222> (416)..(433)

<220>

<221> 人白蛋白

<222> (434)..(1018)

<400> 1

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 Pro
405 410 415

Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
420 425 430
Val Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
435 440 445
Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
450 455 460
Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
465 470 475 480
Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
485 490 495
Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
500 505 510
Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
515 520 525
Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn
530 535 540
Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
545 550 555 560
His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
565 570 575
Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
580 585 590
Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
595 600 605
Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
610 615 620
Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
625 630 635 640
Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
645 650 655
Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
660 665 670
Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
675 680 685
Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
690 695 700
Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
705 710 715 720
His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro

725 730 735

Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr

740 745 750

Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala

755 760 765

Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys

770 775 780

Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His

785 790 795 800

Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu

805 810 815

Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly

820 825 830

Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val

835 840 845

Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly

850 855 860

Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro

865 870 875 880

Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu

885 890 895

His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu

900 905 910

Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu

915 920 925

Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala

930 935 940

Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr

945 950 955 960

Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln

965 970 975

Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys

980 985 990

Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu

995 1000 1005

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

1010 1015

<210> 2

<211> 18

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 2
Pro Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val
<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 3
Pro Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10 15
Pro Asp Val
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 4
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val
1 5

SEQ ID NO: 1 (成熟 rIX-FP)

FIX (aa 1-416)

连接子序列（粗体和下划线的aa 416-433）

人白蛋白序列 (aa 434-1018)

```
1    YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGG   60
61   SCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAEN  120
121  QKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTR  180
181  VVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEE  240
241  TEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFL  300
301  KFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS  360
361  CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTPVSQT  420
421  SKLTRAETVFPDVDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVT  480
481  EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKD  540
541  DNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTE  600
601  CCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAE  660
661  FAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS  720
721  HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLL  780
781  RLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNAL  840
841  LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT  900
901  PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT  960
961  ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL   1018
```

图1