

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-525498

(P2020-525498A)

(43) 公表日 令和2年8月27日 (2020.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00 Z N A	4 C O 7 6
<b>C 0 7 K 14/76 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/76	4 H O 4 5
<b>C 0 7 K 14/745 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/745	
<b>A 6 1 P 7/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/04	
<b>A 6 1 K 47/65 (2017.01)</b>	A 6 1 K 47/65	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-572377 (P2019-572377)	(71) 出願人	518315254
(86) (22) 出願日	平成30年6月29日 (2018.6.29)		ツェー・エス・エル・ベーリング・レング
(85) 翻訳文提出日	令和2年2月7日 (2020.2.7)		ナウ・アクチエンゲゼルシャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/067523		スイス国2543ベルン、レングナウ、イ
(87) 国際公開番号	W02019/002532		ンド ウストリーシュトラッセ11
(87) 国際公開日	平成31年1月3日 (2019.1.3)	(74) 代理人	100127926
(31) 優先権主張番号	62/526,377		弁理士 結田 純次
(32) 優先日	平成29年6月29日 (2017.6.29)	(74) 代理人	100140132
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 竹林 則幸
		(72) 発明者	ヤンヤン・リー
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州1892
			5、ファーロン、フォレスト・ヒル・ドラ
			イヴ3802
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血友病の予防的処置のための第ⅠX因子およびヒトアルブミンを含む融合タンパク質に関する21日の投与計画およびその方法

## (57) 【要約】

本発明は、およそ3週（例えば、21日）の投与間隔における長時間作用性第ⅠX因子（ヒトFⅠX・ヒトアルブミン）約90～110IU/kgを用いた予防的投与計画に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

予防的投与計画において対象における出血を予防する方法における使用のための、

a) ヒト第ⅠX因子 (FⅠX) および

b) ヒトアルブミン

を含む融合タンパク質であって、該 FⅠX は、凝固に關与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なペプチドリinker を介して、該ヒトアルブミンの N 末端と連結されており、該融合タンパク質は、19 から 23 日に 1 回の投与間隔に対して約 90 ~ 110 IU / kg の用量で対象に投与される、前記使用のための融合タンパク質。

10

**【請求項 2】**

投与間隔は、21 日に 1 回である、請求項 1 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 3】**

用量は、静脈投与される、請求項 1 または 2 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 4】**

用量は、約 100 IU / kg である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 5】**

年間出血回数は、1 年当たり 20 回未満である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

20

**【請求項 6】**

年間出血回数は、1 年当たり 3 回未満である、請求項 5 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 7】**

年間自然出血回数は、1 年当たり 15 回未満である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 8】**

年間自然出血回数は、1 年当たり 2 回未満である、請求項 7 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 9】**

30

FⅠX の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 1 %、少なくとも約 2 %、少なくとも約 3 %、少なくとも約 4 %、または 5 から 15 % の間超えるトラフ値を維持する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 10】**

FⅠX の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 2 ~ 4 % 超えるトラフを維持する、請求項 9 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 11】**

リンカーは、FⅠX a によっておよび / または FⅤⅠⅠ a / 組織因子 (TF) によって切断可能である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

40

**【請求項 12】**

リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 から選択される配列を含む、請求項 11 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 13】**

融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 70 % 同一性を有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 14】**

融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列を有する、請求項 13 に記載の使用のための融合タンパク質。

**【請求項 15】**

50

対象は、ヒトである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

【請求項 16】

ヒトは、血友病 B を患っている、請求項 15 に記載の使用のための融合タンパク質。

【請求項 17】

投与のために、約 100 から 400 IU / ml の濃度で提供される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質。

【請求項 18】

予防的投与計画において対象における出血を予防する方法であって、対象に、

a) ヒト第ⅠX因子 (FIX) および

b) ヒトアルブミン

を含む融合タンパク質を、約 90 ~ 110 IU / kg の用量で 19 から 23 日に 1 回の投与間隔で投与すること

を含み、該 FIX は、凝固に関与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なペプチドリナーを介して、該ヒトアルブミンの N 末端と連結されている、前記方法。

【請求項 19】

投与間隔は、21 日に 1 回である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

用量は、静脈投与される、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

用量は、約 100 IU / kg である、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

年間出血回数は、1 年当たり 20 回未満である、請求項 18 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

年間出血回数は、1 年当たり 3 回未満である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

年間自然出血回数は、1 年当たり 15 回未満である、請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

年間自然出血回数は、1 年当たり 2 回未満である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

FIX の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 1 %、少なくとも約 2 %、少なくとも約 3 %、少なくとも約 4 %、または 5 から 15 % の間超えるトラフ値を維持する、請求項 18 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

FIX の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 2 ~ 4 % 超えるトラフ値を維持する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

リンカーは、FIX a によっておよび / または FVIIa / 組織因子 (TF) によって切断可能である、請求項 18 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 から選択される配列を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

該融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 70 % 同一性を有する、請求項 18 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

該融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列を有する、請求項 30 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 3 2】

対象は、ヒトである、請求項 1 8 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

ヒトは、血友病 B を患っている、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

融合タンパク質は、投与のために、約 1 0 0 から 4 0 0 I U / m l の濃度で提供される、請求項 1 8 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

本発明は、およそ 3 週（例えば、2 1 日）の投与間隔における長時間作用性第 I X 因子（ヒト F I X ・ヒトアルブミン）約 9 0 ~ 1 1 0 I U / k g を用いた予防的投与計画に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

血友病 B は、血液凝固の過程に対し中心となる凝固因子である凝固第 I X 因子（F I X）の欠乏の結果として生じる X 連鎖劣性遺伝性出血障害である。血友病 B の徴候および症状は、F I X 欠乏の重症度および出血の場所により多様である。ほとんどの場合、出血は、関節、筋肉および軟部組織への自然出血または外傷によって誘発された出血によって特徴づけられる。同じ場所における再発性の出血は、関節の永久的な損傷につながる場合もある。中枢神経系、咽頭、または胃腸管において、まれだが命に関わる出血が生じることもある。

20

【0 0 0 3】

血友病 B に対する治療の目標は、出血を処置または予防することにより、障害を引き起こす関節および組織損傷を低減し、クオリティオブライフ（Q o L）を向上させることである。F I X による補充療法は、因子欠乏の一時的な補正をもたらし、出血の傾向を小さくする。現在、血友病 B の予防的および出血時処置に、血漿由来および組換え F I X 製品が使用されている。しかしながら、血漿由来製品は、ヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス、および C 型肝炎ウイルスなどの感染性ウイルスの伝染に関するリスクに関連する。血漿由来および組換え F I X 製品はともに、半減期が短いため、出血エピソードの著しい減少を実現するためには週に 2 から 3 回の投与が必要とされる。さらに、出血エピソードを管理するために、繰り返しの投与が必要な場合もあり、投与後の無出血期間は比較的短い。血漿由来または組換え F I X 製品のいずれかの頻繁な静脈（I V）注射の必要性は、患者および障害を処置する医師に大幅な負担を伴う。幼い小児におけるそのような治療計画は、（常にとは限らないが）感染性合併症を回避し、ライン中の凝血塊の発生を予防するために極めて清潔に保たなければならない静脈アクセスデバイスの挿入を必要とする場合が多い。そのようなデバイスに関連するリスクおよび病的状態は、血友病の一部の非常に幼い小児が適切な看護を受けるのを妨げる場合もある。

30

【0 0 0 4】

40

F I X のペグ化形態が形成され、これは、ミニブタおよびイヌにおいて 5 から 7 倍延長された F I X の半減期を示す（非特許文献 1）。患者でも同様の結果が観察された（非特許文献 2）。組換え F I X およびアルブミン（r I X - F P）を含む融合タンパク質は、ラット、ウサギ、および F I X 欠損マウスにおいて、それが、現在販売されている組換え F I X 製品（例えば、r F I X）の公開されている結果と比較して、改善された P K パラメーター（すなわち、増加した回収率、終末相半減期および濃度 - 時間曲線下面積 [A U C]）を有することを実証した（非特許文献 3）。ヒトにおける研究は、r I X - F P の週単位の予防が、より少ない輸注による従前の F I X 製品と比較して、F I X の消費を低減することを示した（非特許文献 4）。

【0 0 0 5】

50

F I Xを含むそのような融合タンパク質の別の例は、r F I X - F cである。特許文献 1 には、F I Xを含む治療効果のあるキメラポリペプチドについて記載されており、これは、F cまたはアルブミンなどのF c R n結合パートナーと融合させることができる。r F I X - F cは、インビボにおいて半減期の延長を示した。この文献は、予防的治療のために、r F I X F cを週に1回20 IU / kg、10日に1回40 IU / kgまたは2週間に1回120 IU / kgで投与することを提言している。非特許文献5も、r F I X - F cが、B e n e F I X（登録商標）（すなわち、r F I X）と比較して半減期、ならびに他のP Kパラメータの増加を示すことを記載している。r F I X - F cに関する第3相試験が最近公開され、これは、50 IU / kgで開始する週に1回の間隔または10日の投与間隔から開始する100 IU / kgで投与される場合、血友病Bの患者の年間出血回数が少なかったことを示している（非特許文献6）。

10

#### 【0006】

特許文献2は、血友病の予防的処置のためのさまざまな用量（25～250 IU / kg）および毎日から月に1回に及ぶ投与間隔での第I X因子を含む融合タンパク質について記載している。A B Rデータは、週に1回の予防（25～35 IU / kg）に関して示されており、F I X活性レベルは、21日間にわたり100 IU / kgを受けた血友病の5人の患者に関して報告されている。治療計画は、100 IU / kgのr I X - F P注射後21日目に少なくとも4.1%のF I X活性を示した。P K結果は、100 IU / kg、21日の投与間隔に関してシミュレートされた。非特許文献7は、r I X - F Pの延長された半減期について記載しており、その集団P Kモデルは、最大2週間の間隔でのr I X - F Pの延長された投与を支持している。

20

#### 【0007】

本発明は、ヒト第I X因子（F I X）およびヒトアルブミンを含む融合タンパク質である長時間作用性第I X因子を用いた予防的投与計画を提供し、F I Xは、凝固に関与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーを介して、ヒトアルブミンのN末端と連結されており、融合タンパク質は、およそ21日の投与間隔に対して約90～110 IU / kgの用量で対象に投与される。

#### 【0008】

アルブミンはヒトF I Xの半減期を延長させるが、切断可能なリンカーがないと、F I Xは、一般に活性が低下するか、または低い。切断可能なリンカーは、アルブミンが原因となる、活性を損なう任意の立体障害からポリペプチドが遊離するのを可能にし、それにより、融合タンパク質の生成を可能にし、これが、F I Xの高モル特異的活性を保持する。そのような融合タンパク質は、改善された半減期およびその切断不可能な同等物と比較して高いモル特異的活性を示す。凝固に関与するタンパク質によって切断が起るとき、これは、非活性化F I Xが、出血事象が起こるまで延長された半減期を有し、ならびに同時のF I Xの活性化およびアルブミンからの切断を可能にする。融合物からアルブミンが遊離した活性化F I Xは、高い活性を有し、アルブミンの喪失のために血液から速やかに除去される。

30

#### 【0009】

先行技術は、切断不可能なリンカーを有するF I Xおよびアルブミンを含む融合タンパク質について記載している。例えば、特許文献3は、多数のさまざまな治療効果のあるポリペプチドの融合ポリペプチドについて記載しており、これは、ヒト血清アルブミンと融合されると、インビボにおける延長された機能的半減期および延長された保存寿命を有することが予想される。例として言及される治療効果のあるポリペプチドの一覧の1つは、第I X因子である。アルブミンとF I Xの間にペプチドリンカーが存在するF I Xの融合物も記載されているが、リンカーが切断可能であることは明記されていない。非特許文献8は、マウスF I X、8アミノ酸のリンカー（G P G<sub>4</sub> T M）、マウスアルブミンおよび22アミノ酸のペプチドタグから構成されるマウス第I X因子アルブミン融合タンパク質、ならびにヒト第I X因子、7アミノ酸のリンカー（G<sub>6</sub> V）およびヒトアルブミンから構成されるヒト第I X因子アルブミン融合タンパク質も示している。S h e f f i e l d

40

50

は、F I Xとアルブミンの間に切断可能なリンカーを使用しておらず、またはそれを使用することも示唆していない。これらの融合タンパク質は、F I Xが活性化するのを可能にするが、アルブミンが存在するため活性が低い。

#### 【 0 0 1 0 】

凝固因子が凝固の間に（F I Xのような）酵素前駆体のタンパク質分解切断によって、または既にタンパク質分解的に「予め」活性化された因子の（組織因子と結合したF V I I aのような）第2のポリペプチドとの接触によって活性化されると、ここで活性化した凝固因子の長い半減期を維持することはもはや望ましくない。それは、長い半減期は、血栓性合併症につながる可能性があり、活性化因子が延長された半減期を有する場合にさらに一層関連するはずであるためである。したがって、本発明の目的は、およそ21日の処置期間による予防的治療に適した長続きするヒトF I Xを提供することである。

10

#### 【 0 0 1 1 】

配列番号1に記載の配列（図1を参照）を有するr I X - F P（組換えヒトF I X・ヒトアルブミン融合タンパク質）は、改善されたP Kパラメーターを示した。具体的には、これは、r F I X（例えば、B e n e f i x（登録商標））と比較して、5.3倍長い半減期（ $t_{1/2}$ ）、7倍低下したC L、および7倍大きいA U Cによって示される血漿中の循環が延長された（非特許文献9）。これは、驚くべきことに、F I X融合タンパク質に関する先行技術によって実証されたものよりも著しく長い投与間隔を用いた血友病の予防的処置を可能にする。

20

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 1 2 】

【 特許文献 1 】 W O 2 0 1 2 / 0 0 6 6 2 4

【 特許文献 2 】 W O 2 0 1 5 / 0 9 5 9 2 5

【 特許文献 3 】 W O 2 0 0 1 / 7 9 2 7 1

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 1 3 】

【 非特許文献 1 】 O s t e r g a a r d , H ら、2011年、B l o o d . 118 ( 8 ) : 2333 ~ 2341 頁

【 非特許文献 2 】 N e g r i e r C ら、B l o o d . 2011年9月8日 ; 118 ( 10 ) : 2695 ~ 701 頁

30

【 非特許文献 3 】 M e t z n e r H J ら、2009年、T h r o m b H a e m o s t . 102 : 634 ~ 644 頁

【 非特許文献 4 】 M a r t i n o w i t z ら、I S T H、アムステルダム、オランダ、6月29日 ~ 7月4日、2013年要約

【 非特許文献 5 】 L u k ら ( 2011年、H a e m o p h i l i a . 17 : 352 ~ 380 頁 )

【 非特許文献 6 】 P o w e l l J S ら、2013年12月12日、N E J M . 369 : 2313 ~ 23 頁

【 非特許文献 7 】 Z h a n g ら ( ( 2016年 )、J o u r n a l o f T h r o m b o s i s a n d H a e m o s t a s i s . 14 : 2132 ~ 2140 頁 )

40

【 非特許文献 8 】 S h e f f i e l d ら ( ( 2004年 )、B r . J . H a e m a t o l . 126 : 565 ~ 573 頁 )

【 非特許文献 9 】 S a n t a g o s t i n o E ら、B l o o d、2012年9月20日 ; 120 ( 12 ) : 2405 ~ 11 頁

#### 【 発明の概要 】

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 1 4 】

本発明は、予防的投与計画において対象における出血を予防する方法における使用のための、

50

- a) ヒト第ⅠX因子 (FⅠX) 部分、および  
b) ヒトアルブミン

を含む融合タンパク質であって、FⅠXは、凝固に関与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なペプチドリナーを介して、ヒトアルブミンのN末端と連結されており、融合タンパク質は、19から23日に1回の投与間隔に対して約90～110 IU/kgの用量で、対象に投与される、融合タンパク質に関する。好適な実施形態において、投与間隔は、21日に1回である。用量は、好ましくは、静脈投与される。極めて好適な実施形態において、用量は、約100 IU/kgである。

【0015】

10

これらの実施形態のいずれか1つにおいて、投与間隔は、19から23日に1回、好ましくは、およそ21日に1回である。あるいは、投与間隔は、26～30日に1回、好ましくは、およそ28日に1回（すなわち、月に1回）である。

【0016】

いくつかの実施形態において、長時間作用性ヒトFⅠXの前記予防的投与計画は、1年当たり20回未満、1年当たり15回未満、1年当たり10回未満、1年当たり9回未満、1年当たり8回未満、1年当たり7回未満、1年当たり6回未満、1年当たり5回未満、1年当たり4回未満、または1年当たり3回未満の年間出血回数をもたらすことが可能である。

【0017】

20

好適な実施形態において、長時間作用性ヒトFⅠXの前記予防的投与計画は、1年当たり20回未満、最も好ましくは、1年当たり3回未満の年間出血回数をもたらす。

【0018】

いくつかの実施形態において、ヒト長時間作用性FⅠXの前記予防的投与計画は、1年当たり15回未満、1年当たり12回未満、1年当たり10回未満、1年当たり9回未満、1年当たり8回未満、1年当たり7回未満、1年当たり6回未満、1年当たり5回未満、1年当たり4回未満、1年当たり3回未満、または1年当たり2回未満の年間自然出血回数をもたらすことが可能である。

【0019】

極めて好適な実施形態において、長時間作用性ヒトFⅠXの前記予防的投与計画は、1年当たり15回未満、最も好ましくは、1年当たり2回未満の年間自然出血回数をもたらす。

30

【0020】

本発明の任意の実施形態に関して、FⅠXの血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約1%超えるトラフ値で維持される。好ましくは、FⅠXの血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約2～5%超える、より好ましくは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約2、3、4、または5%超えるトラフ値で維持される。他のさらに好適な実施形態において、FⅠXの血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを4から15%の間または5から15%の間超えて維持される。

40

【0021】

前記融合タンパク質は、凝固因子を活性化するプロテアーゼによって切断可能なリンカーを有し、それにより、リンカーの切断が、凝固が起こる部位での凝固因子の活性化に関連するのを確実にする。本発明による他の好ましい融合タンパク質は、リンカーが、活性化されると、融合タンパク質の一部である凝固因子によって切断可能であるものであり、それにより、融合タンパク質の切断が凝固事象と関連するのを確実にする。本発明による他の好ましい融合タンパク質は、リンカーが、それ自体が融合タンパク質の一部である凝固因子の活性によって直接または間接的に活性化されるプロテアーゼによって切断可能であるものであり、それにより、融合タンパク質の切断が凝固事象と関連するのを確実にする。

50

## 【 0 0 2 2 】

好適な実施形態において、リンカーは、F I X a によっておよび / または F V I I a / 組織因子 ( T F ) によって切断可能である。

## 【 0 0 2 3 】

特に好適な実施形態において、リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 から選択される配列を含む。

配列番号 2

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

配列番号 3

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

## 【 0 0 2 4 】

代替的な実施形態において、リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 の一方と 9 0 % 同一である。別の実施形態において、リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 の一方と 8 0 % 同一である。さらに別の実施形態において、リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 の一方と 7 0 % 同一である。さらに別の実施形態において、リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 の一方と 6 0 % 同一である。別の実施形態において、リンカーは、配列番号 2 および配列番号 3 の一方と 5 0 % 同一である。

## 【 0 0 2 5 】

好ましくは、本発明の融合タンパク質は、配列番号 1 に記載の配列 ( 図 1 を参照 ) を有する。あるいは、融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 7 0 % の同一性を有する。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 8 0 % の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 8 5 % の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 9 0 % の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 9 5 % の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 9 8 % の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 9 9 % の同一性パーセントを有することが可能である。

## 【 0 0 2 6 】

本発明の目的に対して、融合タンパク質を投与される好ましい対象は、ヒトである。特に好ましいのは、血友病 B を患っているヒトである。

## 【 0 0 2 7 】

本発明の任意の実施形態に関して、融合タンパク質は、投与のために、好ましくは、約 1 0 0 から 4 0 0 I U / m l 、好ましくは、約 1 0 0 、 2 0 0 または 4 0 0 I U / m l の濃度で提供される。融合タンパク質はまた、投与のために、6 0 0 I U / m l または 1 2 0 0 I U / m l の濃度で提供することができる。

## 【 0 0 2 8 】

本発明は、予防的投与計画において対象における出血を予防する方法であって、対象に、

- a ) ヒト第 I X 因子 ( F I X ) 部分、および
- b ) ヒトアルブミン

を含む融合タンパク質を、約 9 0 ~ 1 1 0 I U / k g の用量で 1 9 から 2 3 日に 1 回の投与間隔で投与することを含み、F I X は、凝固に関与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーを介して、ヒトアルブミンの N 末端と連結されている、方法に関する。好適な実施形態において、投与間隔は、2 1 日に 1 回である。用量は、好ましくは、静脈投与される。極めて好適な実施形態

10

20

30

40

50



において、用量は、約 100 IU / kg である。

【0029】

本発明の方法において、投与間隔は、19 から 23 日に 1 回、好ましくは、およそ 21 日に 1 回である。あるいは、投与間隔は、26 ~ 30 日に 1 回、好ましくは、およそ 28 日に 1 回（すなわち、月に 1 回）である。

【0030】

いくつかの実施形態において、長時間作用性ヒト F I X の前記予防的投与計画は、1 年当たり 20 回未満、1 年当たり 15 回未満、1 年当たり 10 回未満、1 年当たり 9 回未満、1 年当たり 8 回未満、1 年当たり 7 回未満、1 年当たり 6 回未満、1 年当たり 5 回未満、1 年当たり 4 回未満、または 1 年当たり 3 回未満の年間出血回数をもたらすことが可能である。

10

【0031】

好適な実施形態において、長時間作用性ヒト F I X の前記予防的投与計画は、1 年当たり 20 回未満、最も好ましくは、1 年当たり 3 回未満の年間出血回数をもたらす。

【0032】

いくつかの実施形態において、長時間作用性ヒト F I X の前記予防的投与計画は、1 年当たり 15 回未満、1 年当たり 12 回未満、1 年当たり 10 回未満、1 年当たり 9 回未満、1 年当たり 8 回未満、1 年当たり 7 回未満、1 年当たり 6 回未満、1 年当たり 5 回未満、1 年当たり 4 回未満、1 年当たり 3 回未満、または 1 年当たり 2 回未満の年間自然出血回数をもたらすことが可能である。

20

【0033】

極めて好適な実施形態において、長時間作用性ヒト F I X の前記予防的投与計画は、1 年当たり 15 回未満、最も好ましくは、1 年当たり 2 回未満の年間自然出血回数をもたらす。

【0034】

本発明の方法に関して、F I X の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 1 % 超えるトラフ値で維持される。好ましくは、F I X の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 2 ~ 5 % 超える、より好ましくは、投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約 2、3、4、または 5 % 超えるトラフ値で維持される。他のさらに好適な実施形態において、F I X の血漿レベルは、投与間隔の全体にわたりベースラインを 4 から 15 % の間または 5 から 15 % の間超えて維持される。

30

【0035】

本発明の方法において、リンカーは、凝固因子を活性化するプロテアーゼによって切断可能であり、それにより、リンカーの切断が、凝固が起こる部位での凝固因子の活性化に関連することを確実にする。本発明による他の好ましい融合タンパク質は、リンカーが、活性化されると、融合タンパク質の一部である凝固因子によって切断可能であるものであり、それにより、融合タンパク質の切断が凝固事象と関連することも確実にする。本発明による他の好ましい融合タンパク質は、リンカーが、それ自体が融合タンパク質の一部である凝固因子の活性によって直接または間接的に活性化されるプロテアーゼによって切断可能であるものであり、それにより、融合タンパク質の切断が凝固事象と関連するのも確実にする。

40

【0036】

好適な実施形態において、リンカーは、F I X a によっておよび / または F V I I a / 組織因子 ( T F ) によって切断可能である。

【0037】

特に好適な実施形態において、リンカーは、以下の配列番号 2 および配列番号 3 から選択される配列を含む：

配列番号 2

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

50

1	5	10	15
配列番号 3			
Pro	Ser	Val	Ser
Gln	Thr	Ser	Lys
Leu	Thr	Arg	Ala
Glu	Thr	Val	Phe
Pro	Asp	Val	
1	5	10	15

## 【0038】

別の実施形態において、リンカーは、配列番号2および配列番号3の一方と90%同一である。別の実施形態において、リンカーは、配列番号2および配列番号3の一方と80%同一である。さらに別の実施形態において、リンカーは、配列番号2および配列番号3の一方と70%同一である。さらに別の実施形態において、リンカーは、配列番号2および配列番号3の一方と60%同一である。さらなる実施形態において、リンカーは、配列番号2および配列番号3の一方と50%同一である。

## 【0039】

好ましくは、本発明の方法は、配列番号1に記載の配列(図1を参照)を有する融合タンパク質を投与する。あるいは、融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも70%の同一性を有する。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも75%の同一性を有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも80%の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも85%の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも90%の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも95%の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも98%の同一性パーセントを有することが可能である。融合タンパク質の配列は、配列番号1に記載の配列と少なくとも99%の同一性パーセントを有することが可能である。

## 【0040】

本発明の方法に関して、融合タンパク質を投与される好ましい対象は、ヒトである。特に好ましいのは、血友病Bを患っているヒトである。

## 【0041】

本発明の任意の方法に関して、融合タンパク質は、好ましくは、約100から400 IU/ml、好ましくは、約100、200または400 IU/mlの濃度で投与される。融合タンパク質はまた、600 IU/mlまたは1200 IU/mlの濃度で投与することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0042】

【図1】成熟rIX-FPのアミノ酸配列(配列番号1)である。FIXは、aa1~416に示されており、リンカー配列は、太字で示され、下線が引かれており(aa416~433)、アルブミン配列は、aa434~1018に示されている。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0043】

「予防的処置」は、本明細書中で使用される場合、対象の血漿中の第IX因子活性のレベルを増加させるために、経時的に第IX因子融合タンパク質を複数用量で対象に投与することを意味する。好ましくは、増加したレベルは、自然出血の発生率を低下させるか、または予想外の損傷の場合に出血を予防するのに十分なものである。予防的処置は、出血エピソード、例えば、出血時処置下において示される出血エピソードを低減または予防する。「投与間隔」において述べられるとおり、例えば、患者間のばらつきを打ち消すために、予防的処置は固定化することも、または個別化することもできる。

## 【0044】

「投与間隔」は、本明細書中で使用される場合、対象に投与される複数の用量間に経過する時間の量を意味する。キメラヒトFIX・ヒトアルブミン、例えば、FIX-FPを使用した本発明の方法における投与間隔は、同等量(IU/kg単位)のヒトアルブミン

を伴わない前記第 I X 因子（すなわち、前記 F I X から成るポリペプチド）に必要とされる投与間隔よりも少なくとも約 1 と 1 / 2 から 8 倍長い場合もある。例えば、本発明のヒト第 I X 因子・ヒトアルブミン融合タンパク質を投与する場合、投与間隔は、同等量のヒトアルブミンを伴わない前記ヒト第 I X 因子に必要とされる投与間隔よりも少なくとも約 1 と 1 / 2 から 8 倍長い場合もある。投与間隔は、同等量のアルブミンを伴わない前記ヒト第 I X 因子（または前記第 I X 因子から成るポリペプチド）に必要とされる投与間隔よりも少なくとも約 1 と 1 / 2 から 8 倍長い場合もある。

【 0 0 4 5 】

「用量中央値」は、本明細書中で使用される場合、試験対象の半分がその用量よりも高い用量を使用し、試験対象の半分がその用量よりも低い用量を使用したことを意味する。

10

「平均用量」は、（すべての用量を合計し、用量の総数で割ることによって算出される）平均用量を意味する。およそ 2 1 日に 1 回、およそ 2 8 日に 1 回、またはおよそ 1 か月に 1 回の投与間隔に関して、「およそ」は、プラスまたはマイナス 2 日を意味する。

【 0 0 4 6 】

「年間出血回数」は、1 年にわたる対象の出血事象の算出された総数を意味する（（出血エピソードの数）/（対象の観察処置期間）× 3 6 5 . 2 5）。「年間自然出血回数」は、1 年にわたる対象の自然出血事象の算出された数を意味する（（自然出血エピソードの数）/（対象の観察処置期間）× 3 6 5 . 2 5）。

【 0 0 4 7 】

「F I X の血漿レベルを少なくとも約」特定のパーセンテージ「のトラフ値に維持すること」は、血漿中の F I X 生物学的活性が F I X を必要とする患者の特定の投与計画中に前記パーセンテージレベル未満に低下しないことを意味し、1 0 0 % の前記 F I X 生物学的活性は、正常なヒト血漿中の F I X 活性濃度である 1 U / m l に相当し、F I X 生物学的活性は、好ましくは、実施例に記載されている実証された凝固一段法を使用して測定される。

20

【 0 0 4 8 】

「トラフ」は、F I X を必要とする患者の処置の間、投与計画全体をとおしての前記 F I X 生物学的活性の最低レベルである。患者間のばらつきのため、トラフレベルは、一般に中央値を参照し、これは、試験対象の半分がそれより高いトラフレベルを有し、試験対象の半分がそれより低いトラフレベルを有したことを意味する。中央値を使用するのがより一般的であるが、すべての患者に関する値を合計し、患者の数で割ることによって求めた平均値として P K データからトラフレベルを算出することも可能あろう。

30

【 0 0 4 9 】

「ベースライン」は、1 0 0 I U / d L または 1 0 0 % であると定義される健康なヒトにおける F I X 活性の I U / d L または % 単位で選択的に表される所与の患者における F I X 活性レベルを意味する。重症の血友病 B では、所与の患者のベースラインレベルはゼロまたはほぼゼロと非常に低い、軽症の血友病では、患者のベースラインは、健康なヒトにおける F I X 活性濃度の 1 % 超、2 % 超または 3 % 超または 4 % 超または 5 % 超など高い可能性がある。i ) ヒト第 I X 因子 ( F I X ) 部分、および i i ) ヒトアルブミンを含む融合タンパク質が本発明に従って投与される場合、まず F I X 活性濃度が急激に増加し、ゆっくりと除去される、すなわち、個々のベースラインレベルに戻っていく。とりわけ、重症の血友病 B では、出血を予防するために F I X 活性濃度が最低レベル未満に低下しないケアが行われなければならない。この最低レベルはトラフレベルと呼ばれる。重症の血友病 B 患者では、ベースラインが実質的にゼロの場合、ベースラインを 1 % 超えるトラフレベルは、健康なヒトにおける F I X 活性濃度の約 1 % の F I X 活性濃度を意味する。健康なヒトにおける F I X 活性濃度の 3 % の F I X 活性のベースラインレベルを有する軽症の血友病 B 患者において、ベースラインを 1 % 超えるトラフレベルは、健康なヒトにおける F I X 活性濃度の約 4 % の F I X 活性濃度を意味する。

40

【 0 0 5 0 】

本発明において、投与間隔は、2 1 日に 1 回（すなわち、1 9 から 2 3 日に 1 回）であ

50

る。最も好適な投与間隔は、3週（21日）である。あるいは、投与間隔は、26～30日に1回、好ましくは、およそ28日に1回（すなわち、月に1回）である。

【0051】

あるいは、投与間隔は、薬物動態学的データまたはその対象についての他の情報に基づいてそれぞれの対象に対して決定される個別の間隔とすることもできる。個別の用量/投与間隔の組み合わせは、前の段落の固定された間隔の治療計画に関するものと同じでも、または異なることも可能である。治療計画は、最初に固定された投与間隔で、その後、個別の投与間隔に変えることができる。治療計画は、最初に固定された用量（IU/kg）および投与間隔で、その後、固定された用量で個別の投与間隔に変えることができる。治療計画はまた、最初に固定された投与間隔および用量（IU/kg）で、その後、同じ固定された投与間隔で個別の用量に変えることができる。

10

【0052】

本発明の方法において使用することができる治療用量は、約90～110 IU/kg、約90～95 IU/kg、約95～100 IU/kg、約100～105 IU/kg、および約105～110 IU/kgである。使用することができる他の治療用量は、110～115 IU/kg、約115～120 IU/kg、約120～125 IU/kg、約125～130 IU/kg、約130～135 IU/kg、約135～140 IU/kg、約140～145 IU/kg、および約145～150 IU/kgである。

【0053】

本発明は、約90～110 IU/kg、約90～105 IU/kg、約90～100 IU/kg、約90～95 IU/kg、約95～110 IU/kg、約95～105 IU/kg、約95～100 IU/kg、約100～110 IU/kg、約100～105 IU/kg、約105～110 IU/kg、約90 IU/kg、約95 IU/kg、約100 IU/kg、約105 IU/kgまたは約110 IU/kgの用量を意図する。使用することができる他の治療用量は、115 IU/kg、約120 IU/kg、約125 IU/kg、約130 IU/kg、約135 IU/kg、約140 IU/kg、約145 IU/kg、および約150 IU/kgである。極めて好ましい実施形態において、用量は、約100 IU/kg、最も好ましくは、100 IU/kgである。

20

【0054】

好ましい用量および投与間隔は：およそ3週に1回の約90～110 IU/kg、およそ3週に1回の約90～105 IU/kg、およそ3週に1回の約90～100 IU/kg、およそ3週に1回の約90～95 IU/kg、およそ3週に1回の約95～110 IU/kg、およそ3週に1回の約95～105 IU/kg、およそ3週に1回の約95～100 IU/kg、およそ3週に1回の約100～110 IU/kg、およそ3週に1回の約100～105 IU/kg、およそ3週に1回の約105～110 IU/kg、およそ3週に1回の約90 IU/kg、およそ3週に1回の約95 IU/kg、およそ3週に1回の約100 IU/kg、およそ3週に1回の約105 IU/kg、およびおよそ3週に1回の約110 IU/kgである。「およそ3週またはそれより長い日数に1回」は、およそ19から23日に1回、およびおよそ20から22日に1回、好ましくは、およそ21日に1回を含む。最も好ましい用量および投与間隔は、3週（すなわち、21日）に1回の100 IU/kgである。先行技術では、3週の投与間隔の臨床効能については開示されていない。

30

40

【0055】

他の好ましい用量および投与間隔は：およそ28日に1回の約90～150 IU/kg、およそ28日に1回の約90～110 IU/kg、およそ28日に1回の約90～105 IU/kg、およそ28日に1回の約90～100 IU/kg、およそ28日に1回の約90～95 IU/kg、およそ28日に1回の約95～110 IU/kg、およそ28日に1回の約95～105 IU/kg、およそ28日に1回の約95～100 IU/kg、およそ28日に1回の約100～110 IU/kg、およそ28日に1回の約100～105 IU/kg、およそ28日に1回の約105～110 IU/kg、およそ28日に

50

1回の約110～115 IU/kg、およそ28日に1回の約115～120 IU/kg、およそ28日に1回の約120～125 IU/kg、およそ28日に1回の約125～130 IU/kg、およそ28日に1回の約130～135 IU/kg、およそ28日に1回の約135～140 IU/kg、およそ28日に1回の約140～145 IU/kg、およそ28日に1回の約145～150 IU/kg、およそ28日に1回の約90 IU/kg、およそ28日に1回の約95 IU/kg、およそ28日に1回の約100 IU/kg、およそ28日に1回の約105 IU/kg、およそ28日に1回の約110 IU/kg、およそ28日に1回の約115 IU/kg、およそ28日に1回の約120 IU/kg、およそ28日に1回の約125 IU/kg、およそ28日に1回の約130 IU/kg、およそ28日に1回の約135 IU/kg、およそ28日に1回の約140 IU/kg、およそ28日に1回の約145 IU/kg、およびおよそ28日に1回の約150 IU/kgである。

10

**【0056】**

「およそ28日以上またはそれより長い日数に1回」は、およそ26から30日に1回、およびおよそ27から29日に1回、好ましくは、およそ28日に1回を含む。極めて好ましい用量および投与間隔は、28日（すなわち、1か月）に1回の100 IU/kgである。

**【0057】**

100 IU/kgのrIX-FP用量の投与後、21日の投与間隔の全体にわたりFIX活性の血漿レベル中央値がベースラインを少なくとも約5%超えるトラフ値を維持する実施形態が、本発明に包含される。100 IU/kgのrIX-FP用量が21日に1回、適用される場合に、FIX活性の血漿レベル中央値が投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約4%超えるトラフ値を維持する実施形態も本発明に包含される。あるいは、FIX活性の血漿レベルを平均値として算出することも可能であろう。

20

**【0058】**

FIX活性の血漿レベル中央値が100 IU/kgのrIX-FP用量の投与後、28日間の投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約5%、4%、3%または2%超えるトラフ値を維持する実施形態も本発明に包含される。100 IU/kgのrIX-FP用量が28日に1回適用される場合に、FIX活性の血漿レベル中央値が投与間隔の全体にわたりベースラインを少なくとも約1%超えるトラフ値を維持する実施形態も本発明に包含される。あるいは、FIX活性の血漿レベルを平均値として算出することも可能であろう。

30

**【0059】**

特に、本発明は、FIXおよびヒトアルブミンを含む融合タンパク質に関する予防的投与計画を提供し、第IX因子（FIX）部分は、凝固に關与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なペプチドリナーを介して、ヒトアルブミンと連結されている。

**【0060】**

リンカーは、FIXの活性化の前の切断を可能にする。rFIX-FP融合タンパク質は、ヒトアルブミンによりFIXの半減期の延長を示すが、出血事象の前に切断が起こるため、活性化の前に活性化FIXの半減期が短縮される。

40

**【0061】**

凝固関連の様式でのタンパク質分解切断は、本発明の意味では、少なくとも1つの凝固因子または凝固補助因子の活性化の結果として起こる任意のタンパク質分解切断である。凝固因子は、リンカーペプチドのタンパク質分解切断とほぼ同時に活性化される（図1参照）。活性化は、例えば、凝固因子のタンパク質分解切断によって、または補助因子との結合によって起こることもある。アルブミンは、出血事象が起こるまで血液中のFIXの半減期を延長させ、出血事象は、同時にFIXを活性化し、アルブミンからそれを切断する。切断は、アルブミンが原因となる、活性を損なう任意の立体障害からポリペプチドを遊離させ、それにより、融合タンパク質の生成を可能にし、これが、FIXの高モル特異

50

的活性を保持する。切断されたF I Xは、その後、アルブミンの喪失のために血液から速やかに除去される。そのような融合タンパク質は、その切断不可能な同等物と比較して増加した、改善された半減期およびモルト異的活性を示す。したがって、r I Xを含む切断不可能な融合タンパク質と比較して、ある治療効果をもたらすために必要とされるr I X - F Pが少ない。

#### 【0062】

本発明による好ましい融合タンパク質は、少なくとも1つの凝固関連アッセイにおいて、アミノ酸配列G G G G G V (配列番号4)を有する切断不可能なリンカーを介して連結された治療効果のある融合タンパク質のものと比較して少なくとも25%増加した治療効果のある融合タンパク質のモルト異的活性、特に、モルト異的凝固関連活性を有するものである。適用可能な少なくとも1つの異なる凝固関連アッセイにおいて、モルト異的活性が少なくとも50%増加した融合タンパク質が、より好ましく、モルト異的活性が少なくとも100%増加したものがさらにより好ましい。

10

#### 【0063】

さらなる実施形態において、リンカーペプチドは、2つ以上のプロテアーゼに対する切断部位を含む。これは、異なるプロテアーゼによって同じ位置で切断可能なリンカーペプチドによって、または2つまたはそれ以上の異なる切断部位を提供するリンカーペプチドによってのいずれかで達成することができる。治療効果のある融合タンパク質は、酵素活性を実現するためにタンパク質分解切断によって活性化されなければならない有利な状況、および異なるプロテアーゼがこの活性化段階に寄与することが可能な有利な状況が存在する場合もある。F I Xの活性化は、F X I aによってまたはF V I I a / 組織因子 (T F) によってのいずれかで達成することができる。好適な実施形態において、リンカーは、F I X aによっておよび / またはF V I I a / 組織因子 (T F) によって切断可能である。

20

#### 【0064】

配列番号1に記載の配列を有するr I X - F P (組換えヒトF I X - ヒトアルブミン融合タンパク質)は、r F I X (例えば、B e n e f i x (登録商標))と比較して、5.3倍長い半減期 ( $t_{1/2}$ )、7倍低下したCL、および7倍大きいAUCによって示される血漿中の長期の循環を有する。さらに、r I X - F Pの薬物動態学的パラメーターを、A l p r o l i x (商標) F D A 処方情報のF I X - F cの対応する薬物動態学的データと比較した場合、r I X - F Pは、r I X - F c (A L P R O L I X (商標))と比較して、約3.8倍高いAUC<sub>0-inf</sub>、約3.7倍低下したCL / BW、約26%高い増分回収率 (i n c r e m e n t a l r e c o v e r y)、約3.2倍低い分布容積、および約19%延長された薬物の平均滞留時間を有する。

30

#### 【0065】

予防は、予想される出血を予防するための因子濃縮物の静脈注射による処置である。予防は、 $>1\text{ IU/dl}$  ( $>1\%$ )の凝固因子レベルを有する中等症血友病患者がめったに自然出血を経験せず、関節機能の維持がはるかに良好であるという観察から考え出された。したがって、出血および関節破壊を予防するために1%超に維持されるF I X活性による予防が正常な筋骨格機能を保護するための治療の目標であるべきである (G U I D E L I N E S F O R T H E M A N A G E M E N T O F H E M O P H I L I A、第2版、P r e p a r e d b y t h e T r e a t m e n t G u i d e l i n e s W o r k i n g G r o u p, o n b e h a l f o f t h e W o r l d F e d e r a t i o n o f H e m o p h i l i a (W F H))。r I X - F P単回投与は、14日およびそれ以上の間、1%を超えるF I X活性を維持することができる。

40

#### 【0066】

注射の頻度が減ることにより、感染症のリスク、患者の苦痛、および必要とされる医療従事者を訪問する回数が減る。こうした利点は、患者のコンプライアンスにプラスの影響を及ぼすことになり、それにより血友病に対する予防的治療の効果にプラスの影響を及ぼすことになる。

50

## 【0067】

## ヒトF I X

ビタミンK依存性ポリペプチドのグループのメンバーの1つであるヒトF I Xは、分子量が57kDaの一本鎖の糖タンパク質であり、これは、415アミノ酸の不活性酵素前駆体として肝臓細胞によって血流に分泌される。これは、ポリペプチドのN末端G1aドメインに局在する12の -カルボキシグルタミン酸残基を含む。G1a残基は、その合成のためにビタミンKを必要とする。G1aドメインに続いて、2つの上皮増殖因子ドメイン、活性化ペプチド、およびトリプシン型セリンプロテアーゼドメインが存在する。F I Xのさらなる翻訳後修飾は、ヒドロキシ化 (A s p 64)、N (A s n 157およびA s n 167) およびO型グリコシル化 (S e r 53、S e r 61、T h r 159、T h r 169、およびT h r 172)、硫酸化 (T y r 155)、ならびにリン酸化 (S e r 158) を包含する。

10

## 【0068】

F I Xは、A r g 145 ~ A l a 146およびA r g 180 ~ V a l 181における活性化ペプチドのタンパク質分解によって、その活性型、第I X a因子に変換されて、2つのポリペプチド鎖、N末端軽鎖 (18kDa) およびC末端重鎖 (28kDa) の形成に至り、これが、1つジスルフィド結合によって一緒にされる。第I X因子の活性化切断は、インビトロにおいて、例えば、第X I a因子または第V I I a因子 / T Fによって実現することができる。第I X因子は、ヒト血漿中に5 ~ 10 μg / mlの濃度で存在する。ヒトにおける第I X因子の終末相血漿中半減期は、約15から18時間であることが分かった (W h i t e G Cら、1997年、R e c o m b i n a n t F a c t o r I X . T h r o m b H a e m o s t . 78 : 261 ~ 265ページ ; E w e n s t e i n B Mら、2002年、P h a r m a c o k i n e t i c a n a l y s i s o f p l a s m a - d e r i v e d a n d r e c o m b i n a n t F I X c o n c e n t r a t e s i n p r e v i o u s l y t r e a t e d p a t i e n t s w i t h m o d e r a t e o r s e v e r e h e m o p h i l i a B . T r a n s f u s i o n 42 : 190 ~ 197ページ)。

20

## 【0069】

半減期延長アルブミン 「ヒト血清アルブミン」 (H S A) および「ヒトアルブミン」 (H A) という用語は、本出願において同義に使用される。「アルブミン」および「血清アルブミン」という用語は、より広く、ヒト血清アルブミン (ならびにそのフラグメントおよび変異体) ならびに他の種由来のアルブミン (ならびにそのフラグメントおよび変異体) を包含する。

30

## 【0070】

本明細書中で使用される場合、「アルブミン」は、アルブミンポリペプチドもしくはアミノ酸配列、またはアルブミンフラグメントもしくはアルブミンの1つまたはそれ以上の機能活性 (例えば、生物学的活性) を有する変異体をまとめて指す。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンまたはそのフラグメント、とりわけ、成熟形態のヒトアルブミンを指す。例えば、アルブミンは、参照によってその全体を本明細書に組み入れるU S 2 0 0 8 2 6 0 7 5 5 A 1に記載の配列またはその変異体を有することが可能である。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、完全長H A配列を含む場合もあり、または治療活性の安定化もしくは延長が可能な1つまたはそれ以上のそのフラグメントを含む場合もある。そのようなフラグメントは、10またはそれ以上のアミノ酸長から成る場合もあり、またはH A配列の約15、20、25、30、50またはそれ以上の連続したアミノ酸を含む場合もあり、またはH Aの特定のドメインの一部もしくはすべてを含む場合もある。

40

## 【0071】

本発明の融合タンパク質のヒトアルブミン部分は、天然または人工のいずれかの正常なH Aの変異体が可能である。本発明の融合タンパク質の治療効果のあるポリペプチド部分は、本明細書に記載されている対応する治療効果のあるポリペプチドの変異体も可能である。「変異体」という用語は、保存的または非保存的のいずれかで、天然または人工のい

50

ずれかの挿入、欠失、および置換を含み、その場合、参照によってその全体を本明細書に組み入れるUS 2008 260755 A 1に記載されているとおり、そのような変化は、治療効果のあるポリペプチドの治療活性を与える活性部位、または活性ドメインを実質的に変えない。

#### 【0072】

本発明は、特に、形成される融合タンパク質が、ヒトアルブミンと連結されていない凝固因子と比較してインビボにおける延長された半減期を有し、融合タンパク質が、適用可能な少なくとも1つの異なる凝固関連アッセイにおいて、切断不可能なリンカーを伴う対応する融合タンパク質と比較して、少なくとも25%高いモル特異的活性を有するように、介在する切断可能なペプチドリンカーが治療効果のあるポリペプチドとヒトアルブミンの間に組み込まれるよう、凝固因子またはそのフラグメントもしくは変異体のヒトアルブミンのN末端との連結を含む融合タンパク質に関する。

#### 【0073】

上記定義内の「第IX因子」は、任意の自然多型を含む天然アミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。これはまた、ポリペプチドが実質的にそれぞれの治療効果のあるポリペプチドの活性を保持する限り、わずかに改変されたアミノ酸配列、例えば、末端アミノ酸欠失もしくは付加を含む、改変されたN末端またはC末端を有するポリペプチドを含む。含まれる変異体は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が野生型配列とは異なる。そのような差異の例としては、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基（例えば、好ましくは1から30アミノ酸残基）のN末端および/もしくはC末端の切断、またはN末端および/もしくはC末端における1つまたはそれ以上の追加の残基の付加、ならびに保存的アミノ酸置換、すなわち、類似の特徴を有するアミノ酸、例えば、（1）小さなアミノ酸、（2）酸性アミノ酸、（3）極性アミノ酸、（4）塩基性アミノ酸、（5）疎水性アミノ酸、および（6）芳香族アミノ酸のグループ内で行われる置換を挙げることができる。そのような保存的置換の例が以下の表に示される。

#### 【0074】

##### 【表1】

表1:アミノ酸の保存的置換

(1)	アラニン	グリシン		
(2)	アスパラギン酸	グルタミン酸		
(3a)	アスパラギン	グルタミン		
(3b)	セリン	トレオニン		
(4)	アルギニン	ヒスチジン	リジン	
(5)	イソロイシン	ロイシン	メチオニン	バリン
(6)	フェニルアラニン	チロシン	トリプトファン	

#### 【0075】

一般に終末相半減期または半減期として求められる本発明の融合タンパク質の生体内半減期は、通常、非融合ポリペプチドの生体内半減期よりも少なくとも約25%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは100%を超えて高い。

#### 【0076】

本発明の融合タンパク質は、切断可能なリンカーを伴わない対応する融合タンパク質と比較して、少なくとも25%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも100%増加したモル特異的活性を有する。

#### 【0077】

この関連でモル特異的活性（またはここでは特に考慮されるモル特異的凝固関連活性）



は、対象の治療効果のあるポリペプチドまたは治療効果のある融合タンパク質のモル（または、例えば、nmol）で表される活性と定義される。モルト異的活性の計算は、試験されるポリペプチドのさまざまな分子量または光学密度の影響を受けない、さまざまなコンストラクトの活性の直接的な比較を可能にする。モルト異的活性は、FIXおよびFIX-FP融合タンパク質に関して下記表2に例示されているとおりに算出することができる。

【0078】

【表2】

表2:精製FIX・HSA融合タンパク質に関して示されるモルト異的活性の計算

製品	OD (280nm, 1%)	MW	活性/体積 /OD <sub>280</sub> (IU/L/OD <sub>280</sub> )	モル吸光度 (1mol/Lの OD <sub>(280)</sub> )	モルト異的活性 (IU/mol)の計算
FIX	13.3 <sup>1)</sup>	57 000	生成物に対して求めた	75810 (= MW x OD <sub>(280, 1%)/10</sub> )	=(活性/体積/OD <sub>280</sub> ) × (1mol/LのOD <sub>280</sub> )
アルブミン	5.7 <sup>2)</sup>	66 300		37791 (= MW x OD <sub>(280, 1%)/10</sub> )	
FIX-FP			生成物に対して求めた	113601 (=FIXおよびアルブミンのモル吸光度の合計)	=(活性/体積/OD <sub>280</sub> ) × (1mol/LのOD <sub>280</sub> )

1) R.G. Di Scipioら、Biochem. 16:6698~706ページ(1977年)

2) C. Chaudhuryら、J. Exp. Med. 197(3):315~322ページ(2003年)

【0079】

モルト異的凝固関連活性を測定するために、凝固過程と関連した酵素または補助因子の活性を測定する任意のアッセイを使用することができる。

【0080】

したがって、「凝固関連アッセイ」は、本発明の意味では、凝固過程に関連する酵素もしくは補助因子の活性を測定するか、または内因性もしくは外因性のいずれかの凝固カスケードが活性化されたことを判断することができる任意のアッセイである。したがって、「凝固関連」アッセイは、aPTT、PT、またはトロンビン生成アッセイのような直接凝固アッセイである場合もある。しかしながら、例えば、特定の凝固因子に適用される発色アッセイのようなその他のアッセイも含まれる。そのようなアッセイまたは対応する試薬に関する例は、対応する凝固因子が不足した血漿（Dade Behring）を用いたPathromtin（登録商標）SL（aPTTアッセイ、Dade Behring）もしくはThromborel（登録商標）S（プロトロンビン時間アッセイ、Dade Behring）、例えば、凝固因子が不足した血漿を使用したトロンビン生成アッセイキット（Technoclone、Thrombinoscope）、Biophen Factor IX（Hyphen BioMed）、Stacloot（登録商標）FVIIa-rTF（Roche Diagnostics GmbH）、Coatest（登録商標）Factor VIII:C/4（Chromogenix）のような発色アッセイ、またはその他である。

【0081】

本発明の目的に関して、上記のアッセイまたは同等の凝固関連アッセイの任意の1つにおける増加は、モルト異的活性の増加を示すと考えられる。例えば、25%の増加は、任意の上記アッセイまたは同等のアッセイにおける25%の増加を指す。

【0082】

FIXに関して、aPTTアッセイが凝固活性の測定に使用されることが多い。しかし

ながら、その他の凝固関連アッセイまたはアッセイ原理も F I X に関するモル特異的活性を測定するために適用することができる。

【 0 0 8 3 】

不活性化凝固因子に関して高いインビボ回収率および長い半減期を有することが望ましいが、血栓形成促進のリスクを回避するために、その活性化後またはその補助因子の活性化後には凝固因子の半減期を制限するのが有利である。したがって、凝固過程が開始した後で、活性凝固因子の半減期が再び短縮されるべきである。これは、凝固関連様式で不活性化を増大させることによってまたは凝固因子の除去によってのいずれかで達成することができる。

【 0 0 8 4 】

本発明による不活性化は、例えば、凝固因子と対応する凝固因子のインヒビターとの複合体形成によって、または例えば、F V I I I および F V の場合に知られている、さらなるタンパク質分解切断によって引き起こすことができる、治療効果のあるポリペプチドの活性の低下を意味する。

【 0 0 8 5 】

活性化された治療効果のある融合タンパク質の不活性化速度は、例えば、インヒビターとの反応によってまたはタンパク質分解不活性化によって活性が低下していく速度と定義される。不活性化速度は、生理学的な量のこの凝固因子のインヒビターの存在下において経時的に活性化凝固因子のモル特異的活性を追跡することによって測定することができる。

【 0 0 8 6 】

あるいは、不活性化速度は、活性化生成物を動物に投与し、それに続いて活性および抗原アッセイを使用して適切な時間枠で血漿サンプルを試験することによって求めることができる。

【 0 0 8 7 】

活性化された治療効果のある融合タンパク質の排出速度は、ポリペプチドがヒトまたは動物の血液循環から排出される速度と定義される。排出速度は、静脈投与後の活性化された治療効果のある融合タンパク質の薬物動態を測定することによって求めることができる。抗原アッセイを使用して、血液循環からの直接的な除去により排出を求めることができる。さらに活性アッセイを使用して、特異的除去および不活性化速度を求めることができる。

【 0 0 8 8 】

本発明によると、F I X は、凝固に関与するプロテアーゼまたは凝固酵素によって活性化されるプロテアーゼによって切断可能なリンカーを介して、ヒトアルブミンの N 末端と連結されている。リンカーは非免疫原性でなければならず、プロテアーゼによる切断を可能にするだけ十分に柔軟でなければならない。

【 0 0 8 9 】

切断可能なリンカーは、好ましくは、

- a) 治療効果のあるポリペプチドの活性化の過程でタンパク質分解切断されるタンパク質分解切断部位を含む場合に、それ自体が投与される治療効果のあるポリペプチド、
  - b) この治療効果のあるポリペプチドの基質ポリペプチド、または
  - c) 治療効果のあるポリペプチドの直接的もしくは間接的な関与によって活性化もしくは形成されるプロテアーゼによって切断される基質ポリペプチド
- 由来の配列を含む。

【 0 0 9 0 】

さらに好適な実施形態におけるリンカー領域は、適用される治療効果のあるポリペプチドの配列を含み、これが、発現融合タンパク質のネオアンチゲン特性のリスクを低下させるはずである。

【 0 0 9 1 】

リンカー配列は、F I X の活性化領域の配列由来、F X もしくは F V I I I のような F I

10

20

30

40

50

Xの任意の基質の切断領域由来、または活性化にFIXaが関与するプロテアーゼによって切断される任意の基質ポリペプチドの切断領域由来のいずれかである。

【0092】

極めて好適な実施形態において、リンカーペプチドは、FIX自体に由来する。別の好適な実施形態において、リンカーペプチドは、FXもしくはFVII由来である。別の好適な実施形態において、FIXの生理学的に関連した2つの活性化因子であるFXIaまたはFVIIa/TFによって切断することができるリンカー配列は、2つの切断配列を含む。

【0093】

リンカーが、リンカーを切断するプロテアーゼ（複数可）によって依然として切断可能な限り、記載されているリンカーの変異体およびフラグメントも本発明に包含される。「変異体」という用語は、保存的または非保存的のいずれかの挿入、欠失および置換を含む。

【0094】

医薬組成物および投与様式

本発明の融合タンパク質は、投与に適した医薬組成物に組み込むことができる。そのような組成物は、一般に本タンパク質および薬学的に許容される担体を含む。本明細書中使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、薬学的な投与に適合した任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張化剤、吸収遅延剤（absorption delaying agent）などを含むことが意図される。適した担体は、参照によって本明細書に組み入れる本分野における標準的な参考テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されている。そのような担体または希釈剤の好適な例としては、水、生理的食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば、不揮発性油も使用することができる。薬学的に活性な物質に対する、そのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野においてよく知られている。従来のある媒体または薬剤が活性化化合物と不適合である場合にだけ、組成物にその使用が考えられる。補足の活性化化合物も組成物に組み込むことができる。

【0095】

本発明の医薬組成物は、その意図される投与経路と適合するよう製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）；経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の構成成分を含むことが可能である：滅菌された希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩、および張性の調節のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロス。酸または塩基；例えば、塩酸または水酸化ナトリウムによりpHを調節することができる。非経口調製物は、ガラスもしくはプラスチックでできたアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに封入することができる。静脈注射としての投与が、投与の好適な経路である。

【0096】

注射用途に適した医薬組成物としては、（水溶性の場合）滅菌水溶液または分散液、および滅菌された注射可能な溶液または分散液の即席の調製のための滅菌された粉末が挙げられる。静脈投与に適した担体としては、生理的食塩水、静菌水、Cremophor EL（BASF、パーシッパニー、ニュージャージー州）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。あらゆる場合において、組成物は、滅菌されていなければならない、シリンジ操作が容易になる程度まで流体であるべきである。組成物は、製造および保管の条

10

20

30

40

50

件下において安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール、など）、および適したそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒が可能である。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には、必要とされる粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、さまざまな抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に等張化剤、例えば、砂糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを含むのが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期の吸収は、組成物に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによって引き起こすことができる。

10

#### 【0097】

滅菌された注射可能な溶液は、必要に応じて、活性化合物（例えば、 $rIX-FP$ ）を必要量で、上で挙げられた成分の1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒に組み込み、続く過滅菌によって製造することができる。一般に、分散液は、ベースの分散媒および上で挙げられたもののうち必要とされるその他の成分を含む滅菌されたビヒクルに活性化合物を組み込むことによって製造される。滅菌された注射可能な溶液の調製のための滅菌された粉末の場合、製造の方法は、予め滅菌し過したその溶液から活性成分プラス任意の追加の所望の成分の粉末を得る真空乾燥およびフリーズドライである。

20

#### 【0098】

注射用製剤は、第IX因子（ $FIX$ ）融合タンパク質（例えば、 $rFIX-FP$ ）を治療有効量で含むことが可能であり、その量は、当業者が決定することができる。特に、第IX因子（ $FIX$ ）融合タンパク質（例えば、 $rFIX-FP$ ）は、約100から400 IU/mlの濃度で投与することができる。例えば、融合タンパク質は、投与のために、約100、200または400 IU/mlの濃度で提供することができる。融合タンパク質は、投与のために、600 IU/mlおよび1200 IU/mlなどのより高い濃度で提供される場合もある。

#### 【0099】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、注射用組成物などの医薬組成物を単位剤形に製剤化するのがとりわけ有利である。単位剤形は、本明細書中で使用される場合、処置される対象に対する単位投与量として適した物理的に個別の単位を指し；各単位は、必要とされる医薬担体と関連した所望の治療効果をもたらすよう算出された活性化合物の所定の量を含有する。単位剤形に関する仕様は、活性化合物の固有の特徴および達成される特定の治療効果によって決定され、それに直接依存する。

30

#### 【0100】

医薬組成物は、投与のための説明書とともに容器、パック、またはディスペンサーに含めることが可能である。

#### 【0101】

これまで本発明を詳細に記載してきたが、これは、例示のためだけに含まれ、本発明を限定することは意図しない以下の実施例を参照することによってさらに明確に理解されるであろう。本明細書において参照されるすべての特許および公報を明白に参照により組み入れる。

40

#### 【実施例1】

#### 【0102】

血友病Bの対象における組換え凝固第IX因子アルブミン融合タンパク質（ $rIX-FP$ ）を用いた21日の予防的投与計画の試験

本試験は、出血エピソードを予防するため、ならびにこの投与間隔の安全性および薬物動態（PK）を評価するために $rIX-FP$ （組換えヒト $FIX$ ・ヒトアルブミン融合タンパク質）の投与に関する21日の予防的治療計画の効果を評価することを目的とした。

50

## 【0103】

rIX-FPを50～75IU/kg用いた14日の予防的治療計画は、血友病B患者における出血エピソードを予防することにおいて効果的であり、2.13のABR（中央値0.92、Q1:Q3:0.3.19）および1.19のASBR値（中央値0、Q1:Q3:0.1.58）を得た（n=48、490日の平均継続期間）。この試験において、100IU/kgのrIX-FPを用いた21日の投与間隔がこれらの血友病患者における出血エピソードを予防することにおいて効果的であるかどうかを調査した。

## 【0104】

## 患者

すべての患者は、先天的な第IX因子（FIX）欠乏症（血友病B）であった。14日のrIX-FPの治療計画（48人の患者）を予め受けた11人の患者を21日の治療計画に切り換えた。対象は、21日に1回静脈内に100IU/kgのrIX-FPの予防的処置を受けた。14日の治療計画下では、これらの患者は、0.47のABR値（中央値:0、Q1:Q3:0.1）および0.18のASBR値（中央値:0、Q1:Q3:0.0）を有し、295日間の14日の治療計画を使用して処置した。試験の積極的処置期間（active treatment period）の間に起こったすべての出血事象は、rIX-FPで処置した。すべての対象は、定期的な予防および出血事象の処置の両方のためにrIX-FP処置を自分で施し、処置および出血事象を対象が電子手帳に記録した。

## 【0105】

## 試験目的およびエンドポイント

試験の主目標は、rIX-FPで処置される出血の予防に関するrIX-FPを用いた21日の定期的な予防投与計画の臨床反応を評価することであった。

## 【0106】

## 分析方法

FIX活性は、実証された凝固一段法を使用して測定した。簡単にいえば、試験サンプルを等量のFIX除去血漿と混合し、活性化剤としてPathromtin SL（Siemens Healthcare Diagnostics、マールブルグ）を使用した活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のインビトロ測定によって試験し、rIX-FP活性測定は、Behring Coagulation System（BCS）を使用して行った。その結果を、FIXに対するWHO基準（国際的血液凝固因子II、VII、IX、X、ヒト、血漿）に対して製造業者が校正した標準ヒト血漿（SHPL）から作製した基準曲線を使用して解釈し、その結果を基準のパーセントまたは国際単位で報告している。

## 【0107】

インヒビターを、ナイメゲン変法に従ったベセスダ法、ヒトクエン酸血漿中におけるaPTTのインビトロ測定に基づく凝固アッセイによって定量した。0.6ベセスダ単位（BU）の結果を陽性の結果と定義した。

## 【0108】

FIX活性、FIX抗原、インヒビターおよびrIX-FPに対する抗体の分析をCSL Behring、マールブルグ、ドイツの中央研究室で行った。

## 【0109】

## 効能

出血事象の処置に対するrIX-FPの効能を判定するために、止血を実現するための輸注の数を表にした。さらに、治験責任医師が出血事象の処置の効能を4段階評価し、これは、対象が受けた輸注の数ならびに対象が報告した処置後の痛みの緩和の両方を考慮に入れた。

## 【0110】

21日の治療計画に関する年間自然出血回数は、少なくとも12週の処置が完了した21日の処置期間中に処置が必要とされた自然出血の数によって導き出された。

## 【0111】

## 医薬品

rIX-FPは、CHO細胞において合成されるおよそ125,000Daの分子量の一本鎖の糖タンパク質である。製造および製剤化には、動物またはヒト由来の賦形剤は添加しない(Metzner HJ、Weimer T、Kronthaler Uら、Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of Factor IX. Thrombosis and Haemostasis 2009年; 102: 634~44頁)。

## 【0112】

rIX-FPは、FIX活性化に關与する内因性FIX配列由来の短い切断可能なリンカーによって、組換えヒト凝固FIXを組換えヒトアルブミンと連結している高度に精製された組換え融合タンパク質である。リンカーは、血液凝固の過程でFIXを活性化する同じ酵素、例えば、凝固第XIa因子または第VIIa因子/組織因子によって融合タンパク質から切断され、アルブミン部分を除去する。rIX-FPは、500および1000IU/バイアルの単回使用バイアル中のIV注射用の凍結乾燥した滅菌製剤として供給され、注射用の滅菌水2.5mLで再構成した。

## 【0113】

## 結果

## 用量

静脈内の100IU/kgの予防用量のrIX-FPを429日の平均継続期間の間に21日に1回すべての対象に与えた(表3を参照)。これは、rIX-FPが7、10および14日の投与間隔で投与された時間の長さと同様であった。7日、10日および14日の治療計画試験に関するrIX-FP投与の平均継続期間も表3に示す。

## 【0114】

## 【表3】

表3:治療計画別の出血エピソードに対する処置期間の継続期間(日)

統計情報	7日の治療計画	10日/1か月に3回の治療計画	14日の治療計画	21日の治療計画
n	44	24	48	11
平均(STD)	465.7 (255.22)	452.1 (312.95)	490.2 (246.40)	429.3 (216.91)
中央値	459.0	449.0	518.5	491.0
最小、最大	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
合計	20489	10850	23531	4722

## 【0115】

## 効能

21日のプロトコールは、非常に低い平均AsBRおよび平均ABR値をもたらした。ABRは、1.1(中央値:0、Q1:Q3:0、2.1)であり、AsBRは、0.53(中央値:0、Q1:Q3:0、0)であった(14日から21日に切り換えた1人の対象は、8週未満の継続期間を有し、この出血回数は、計算には使用しなかった)。結果を表4に示す。

## 【0116】

【表 4】

表4:治療計画別のAsBRおよびABR

	統計情報	7日の 治療計画	10日/1か月に 3回の治療計画	14日の 治療計画	21日の 治療計画
年間総 出血回数	n	42	21	48	10
	平均(STD)	2.90 (3.009)	2.45 (2.801)	2.13 (2.887)	1.10 (1.628)
	中央値	2.04	1.25	0.92	0.00
	最小、最大	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
年間 自然 出血回数	n	42	21	48	10
	平均(STD)	1.31 (2.360)	0.87 (1.865)	1.19 (2.167)	0.53 (1.491)
	中央値	0.00	0.00	0.00	0.00
	最小、最大	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

10

【0117】

21日に1回 r I X - F P を受けている患者間の出血回数の変動を表5に示す。3人の患者のみが2を超える A B R を有し、1人の患者のみが1を超える A s B R を有した。対象0020に関するわずかに多い出血回数以外、結果は極めて一貫しており、21日の投与プロトコルの患者に関する極めて少ない出血回数を示す。

20

【0118】

【表 5】

表5:21日に1回rIX-FPを受けている患者間の個々の出血回数

対象識別 表示	治療計画	年齢群	試験に関する 継続期間(日)	全処置期間 (日)	ABR	AsBR
1	21日の 治療計画	≥12～65歳	772	385	4.7	4.7
2	21日の 治療計画	≥12～65歳	784	487	0.0	0.0
3	21日の 治療計画	≥12～65歳	793	491	0.0	0.0
4	21日の 治療計画	≥12～65歳	786	526	0.0	0.0
5	21日の 治療計画	≥12～65歳	860	586	0.0	0.0
6	21日の 治療計画	≥12～65歳	759	146	2.5	
7	21日の 治療計画	≥12～65歳	648	64		
8	21日の 治療計画	≥12～65歳	886	693	2.1	0.0
9	21日の 治療計画	≥12～65歳	874	547	0.0	0.0
10	21日の 治療計画	≥12～65歳	840	652	1.7	0.6
11	21日の 治療計画	≥12～65歳	632	145	0.0	0.0

10

20

【0119】

2017年3月の終わりのデータカットに基づいて更新された結果  
試験全体で83人の患者が参加した。

30

【0120】



【表 6】

表6:人口統計学

	≥12歳 n=59	<12歳 n=24	合計 N=83
年齢(歳)、平均(範囲)	36.0 (13-63)	7.0 (2-11)	27.7 (2-63)
<18 歳、n(%) ≥18 歳、n(%)	5 (8.5) 54 (91.5)	24 (100) 0	29 (34.9) 54 (65.1)
人種、n(%) 白人 アジア人 黒人	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)
民族、n(%) ヒスパニック系 非ヒスパニック系	0 59 (100)	2 (8.3) 22 (91.7)	2 (2.4) 81 (97.6)

10

20

## 【0121】

延長試験の開始時、12歳のPTPは、7日(n=19)、10日(n=13)または14日(n=27)の投与間隔であった。<12歳のPTPは、7日(n=18)、10日(n=2)または14日(n=4)の投与間隔であった。

30

## 【0122】

データカットの時点において、12歳のPTPの79%が10(n=12)、14(n=26)または21日(n=9)の投与間隔であった。

## 【0123】

18歳の11人のPTPを、試験中に21日の治療計画に切り換え、そのうちの2人を、出血頻度を減少させるために14日に戻した。

## 【0124】

データカットの時点において、<12歳のPTPの25%が10(n=1)または14日の投与間隔であった；少ない出血回数を維持するために、2人の患者を、14日の治療計画から10(n=1)または7日(n=1)の治療計画に戻し、2人の患者を、10日の治療計画から7日の治療計画に切り換えた。

40

## 【0125】

それぞれの投与計画に関するABRおよびAsBRを算出した；分析は、延長試験中の任意の時点においてそれぞれの治療計画を受けた患者の総数を含む(表7)。

## 【0126】

【表 7】

表7:さまざまな投与計画にわたるAsBRおよびABR

治療計画*		7日	10日	14日	21日
≥12歳(n=59)		n=21	n=17	n=40	n=11
AsBR	中央値 (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 (SD)	1.38 (1.91)	0.50 (0.90)	1.21 (2.28)	0.62 (1.42)
ABR	中央値 (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 (SD)	2.49 (2.632)	1.68 (2.075)	1.95 (2.851)	1.18 (1.603)
<12歳(n=24)		n=21	n=7	n=8	N/A
AsBR	中央値 (Q1,Q3)	0.00 (0.00, 0.59)	0.00 (0.00, 3.06)	0.75 (0.00, 2.86)	N/A
	平均 (SD)	0.73 (1.75)	1.52 (2.90)	1.53 (1.86)	N/A
ABR	中央値 (Q1,Q3)	2.31 (0.96, 4.21)	2.82 (0, 6.11)	3.11 (1.63, 5.77)	N/A
	平均 (SD)	3.18 (3.259)	3.84 (3.843)	3.56 (2.650)	N/A

## 【0127】

## 考察

この試験は、血友病 B 患者における出血エピソードを予防することにおいて非常に効果的であったため、出血エピソードを予防するために 21 日の投与間隔を使用することを初めて支持している。特に長い投与間隔を考慮すると、出血回数は極めて少なかった。rIX-FP を静脈内投与することの不都合さのため、より長い投与間隔は、有利であり、患者にとってより都合がよい。このことは、患者のコンプライアンスを高め、血友病 B 患者における出血事象のさらに良好な管理をもたらすはずである。

## 【 図 1 】

配列番号 1 ( 成熟 rIX-FP)

FIX (aa 1-416)

リンカー配列 (太字と下線で示される aa 416-433)

ヒトアルブミン配列 (aa 434-1018)

```
1   YNSGKLEEFVQGNLERECMEKCSFEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNFCLNGG   60
61  SCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDTNCKNRCQFCCKNSADNKVVCSTEGYRLAEN   120
121 QKSCEPAVPFPFCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTR   180
181 VVGGE DAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWI VTAACHCVETGVKITVVAGEHNIEE   240
241 TEHTEQKRN VIRII PHHNYNAAINKYNHDIALLLELDEPLVLNSYVTPICIA DKEYTNIFL   300
301 KFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS   360
361 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKRGYGIYTKVSRVYNNWIKETKLTTVVSQT   420
421 SKLTRAETVFPDQVDAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLLQCCPFEDHVKLVNEVT   480
481 EFAKTCVADESAENCDSLH TLFQDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFIQHKD   540
541 DNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTE   600
601 CCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAE   660
661 FAEVSKLVTDLT KVHTECCGGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLECCCKPLLEKS   720
721 HCTIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLL   780
781 RLAKTYETTTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNCLEFQLG EYKFQNAL   840
841 LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT   900
901 PVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT   960
961 ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGL   1018
```

## 【 配列表 】

2020525498000001 .app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/067523

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/48 C12N9/64  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/052490 A1 (BIOGEN IDEC INC [US]) 3 April 2014 (2014-04-03) paragraph [0007] - paragraph [0032]; figures 1-22; examples 1-10 -----	1-34
X	EP 3 086 804 A1 (CSL LTD [AU]) 2 November 2016 (2016-11-02) page 2 - page 33; figures 1-12; example 3 ----- -/--	1-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 2018

Date of mailing of the international search report

10/08/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seranski, Peter

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/067523

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	E. SANTAGOSTINO ET AL: "Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients", BLOOD, vol. 120, no. 12, 20 September 2012 (2012-09-20), pages 2405-2411, XP055355107, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-05-429688 the whole document	1-34
A	----- MARTINOWITZ URI ET AL: "Phase I/II, open-label, multicenter, safety, efficacy and PK study of a recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in subjects with hemophilia B", THROMBOSIS RESEARCH, vol. 131, 1 January 2013 (2013-01-01), XP028525643, ISSN: 0049-3848, DOI: 10.1016/S0049-3848(13)70152-X the whole document	1-34
A	----- SANTAGOSTINO ELENA: "PROLONG-9FP clinical development program - phase I results of recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with recombinant albumin (rIX-FP)", THROMBOSIS RESEARCH, vol. 131, 1 January 2013 (2013-01-01), XP028525644, ISSN: 0049-3848, DOI: 10.1016/S0049-3848(13)70151-8 the whole document	1-34
A	----- SCHULTE ET AL: "Half-life extension through albumin fusion technologies", THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, vol. 124, 1 December 2009 (2009-12-01), pages S6-S8, XP026812470, ISSN: 0049-3848 [retrieved on 2009-12-01] the whole document -----	1-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/067523

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014052490	A1	03-04-2014	EP 2900328 A1	05-08-2015
			HK 1213521 A1	08-07-2016
			TW 201427685 A	16-07-2014
			TW 201811361 A	01-04-2018
			US 2015252345 A1	10-09-2015
			US 2018002684 A1	04-01-2018
			WO 2014052490 A1	03-04-2014
-----				
EP 3086804	A1	02-11-2016	AU 2014373618 A1	21-07-2016
			CA 2934081 A1	02-07-2015
			CN 105848669 A	10-08-2016
			EP 3086804 A1	02-11-2016
			JP 2017502036 A	19-01-2017
			KR 20160093735 A	08-08-2016
			RU 2016129911 A	30-01-2018
			SG 11201604860R A	28-07-2016
			US 2016346366 A1	01-12-2016
			WO 2015095925 A1	02-07-2015
-----				

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/62 (2006.01)		C 1 2 N 15/62		Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)		C 1 2 N 15/12		

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 デブラ・ベンセン - ケネディ  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 6 0 . フェニックスビル . ホースシュー・ポイント 8 0

(72) 発明者 アイリス・ジェイコブズ  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 0 6 . キング・オブ・プルシア . アッシュトン・ドライブ  
4 2 4

(72) 発明者 クリスティーネ・フォークト  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 3 3 . デヴォン . ハイランド・アベニュー 3 1 5

F ターム ( 参考 ) 4C076 AA95 BB13 CC14 CC41 EE41A FF31 GG41  
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA42 DA65 DA70 EA24 FA74