



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109843319 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201780042142.6

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2017.07.07

利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 张小勇

62/359,745 2016.07.08 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/48(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/38(2006.01)

2019.01.07

A61P 7/04(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/067127 2017.07.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/007601 EN 2018.01.11

(71)申请人 康诺贝林伦瑙有限公司

权利要求书3页 说明书27页 附图7页

地址 瑞士伦瑙

(72)发明人 C·沃格特 S·普利

J·罗伯特斯 M·诺尔蒂

(54)发明名称

长效因子IX在人中的皮下施用

(57)摘要

本发明涉及在人患者中预防性皮下施用长效因子IX(即与人白蛋白融合的人FIX)的临床相关给药方案。

1. 一种融合蛋白,其包含
  - a) 人因子IX (FIX), 和
  - b) 人白蛋白

其用于在预防性给药方案中预防人患者的出血的方法中使用,其中人FIX通过肽接头与人白蛋白的N末端连接,所述肽接头能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割,并且其中所述融合蛋白待以约10-50IU/kg的剂量、使用约每天一次至约每周一次的给药间隔皮下施用至所述受试者。

2. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约10IU/kg。
3. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg。
4. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约50IU/kg。
5. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。
6. 根据权利要求2使用的融合蛋白,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次。
7. 根据权利要求3使用的融合蛋白,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。
8. 根据权利要求4使用的融合蛋白,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。
9. 根据权利要求3使用的融合蛋白,其中所述给药间隔为约每天一次。
10. 根据权利要求3使用的融合蛋白,其中所述给药间隔为约每2天。
11. 根据权利要求3使用的融合蛋白,其中所述给药间隔为约每3天。
12. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8至约34IU/dL。
13. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约17IU/dL。
14. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4至约17IU/dL。
15. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8IU/dL。
16. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约2.5至约12IU/dL。
17. 根据权利要求1使用的融合蛋白,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约5IU/dL。
18. 根据权利要求1至17中任一项使用的融合蛋白,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约1%的谷值水平。
19. 根据权利要求1至17中任一项使用的融合蛋白,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约3%的谷值水平。
20. 根据权利要求1至17中任一项使用的融合蛋白,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约5%的谷值水平。

21. 根据权利要求1至17中任一项使用的融合蛋白,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约10%的谷值水平。

22. 根据权利要求1至17中任一项使用的融合蛋白,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约15%的谷值水平。

23. 根据权利要求1至22中任一项使用的融合蛋白,其中所述接头能够被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)切割。

24. 根据权利要求23使用的融合蛋白,其中所述接头包含选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列。

25. 根据权利要求23或24使用的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少70%的同一性。

26. 根据权利要求23或24使用的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列具有SEQ ID NO:3所示的序列。

27. 根据权利要求1至26中任一项使用的融合蛋白,其中所述人患者患有血友病B。

28. 根据权利要求1至27中任一项使用的融合蛋白,其中提供所述融合蛋白用于以约100至400IU/ml的浓度施用。

29. 根据权利要求28使用的融合蛋白或方法,其中提供所述融合蛋白用于以约100、200或400IU/ml的浓度施用。

30. 一种在预防性给药方案中预防人患者的出血的方法,其包括向所述受试者以约每天一次至约每周一次的给药间隔皮下施用约10-50IU/kg剂量的融合蛋白,所述融合蛋白包含

a) 人因子IX(FIX),和

b) 人白蛋白,

其中人FIX通过肽接头与人白蛋白的N末端连接,所述肽接头能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割。

31. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约10IU/kg。

32. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg。

33. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约50IU/kg。

34. 根据权利要求30的方法,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

35. 根据权利要求31的方法,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次。

36. 根据权利要求32的方法,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

37. 根据权利要求33的方法,其中所述给药间隔是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

38. 根据权利要求32的方法,其中所述给药间隔为约每天一次。

39. 根据权利要求32的方法,其中所述给药间隔为约每2天。

40. 根据权利要求32的方法,其中所述给药间隔为约每3天。

41. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每天一次,

并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8至约34IU/dL。

42. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约17IU/dL。

43. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4至约17IU/dL。

44. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8IU/dL。

45. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约2.5至约12IU/dL。

46. 根据权利要求30的方法,其中所述剂量为约25IU/kg,所述给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约5IU/dL。

47. 根据权利要求30至46中任一项的方法,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约1%的谷值水平。

48. 根据权利要求30至46中任一项的方法,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约3%的谷值水平。

49. 根据权利要求30至46中任一项的方法,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约5%的谷值水平。

50. 根据权利要求30至46中任一项的方法,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约10%的谷值水平。

51. 根据权利要求30至46中任一项的方法,其中在整个给药间隔内, FIX的血浆水平维持高于基线至少约15%的谷值水平。

52. 根据权利要求30至51中任一项的方法,其中所述接头能够被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)切割。

53. 根据权利要求52的方法,其中所述接头包含选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列。

54. 根据权利要求52或53的方法,其中所述融合蛋白的序列与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少70%的同一性。

55. 根据权利要求52或53的方法,其中所述融合蛋白的序列具有SEQ ID NO:3所示的序列。

56. 根据权利要求30至55中任一项的方法,其中所述人患者患有血友病B。

57. 根据权利要求30至56中任一项的方法,其中提供所述融合蛋白用于以约100至400IU/ml的浓度施用。

58. 根据权利要求57的方法,其中提供所述融合蛋白用于以约100、200或400IU/ml的浓度施用。

## 长效因子IX在人中的皮下施用

### 发明领域

[0001] 本发明涉及在人患者中预防性皮下施用长效因子IX(即与人白蛋白融合的人FIX)的临床相关给药方案。

### [0002] 发明背景

[0003] 血友病B是由凝血因子IX(FIX)缺乏引起的X连锁隐性遗传性出血性疾病,凝血因子IX是血液凝血过程中的核心凝血因子。血友病B的体征和症状是可变的,取决于FIX缺乏的严重程度和出血的位置。最经常的情况下,出血的特征是关节、肌肉和软组织的自发性或创伤引起的出血。同一位置的复发性出血可能导致关节永久性损伤。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] 目前,预防被认为是严重血友病患者的最佳护理,因为它降低所有出血事件的发生率,并且当在年轻时开始时,还减少关节病的发展。

[0005] 在静脉内应用途径的临床研究中,与人白蛋白融合的长效人FIX(“rIX-FP”)已显示在静脉内施用时具有长的半衰期,并且完成的临床研究显示出极好的安全性和有效性。使用rIX-FP进行7天、10天或14天预防性治疗的受试者的中位年度自发出血率(AsBR)为0.00。在<12岁的儿童中,每周一次(7天)预防后每个受试者的总体中值AsBR为每年0.00次出血。用1或2次rIX-FP注射成功治疗出血事件;成人研究(研究CSL654\_3001)中出血事件为98.6%,儿童研究(CSL654\_3002)中出血事件为97.2%。这种长效因子IX是血友病管理的一项重大改进,因为与单独的FIX相比,它允许对患者的较少频率的静脉内施用。

[0006] US5925739A中描述了包含具有至少200IU/ml活性的因子VIII或因子IX和增加其皮下施用的生物利用度的添加剂的药物制剂及其在制备用于治疗血友病B的药物中的用途,但仅提供了因子VIII的数据。在W02012/006624中,描述了包含FIX的治疗性嵌合多肽,其能够与FcRn结合配偶体例如Fc融合。该文献提示以约每周一次或更长的间隔施用至少约10IU/kg FIXFc用于预防性治疗。该文献仅公开了FIXFc融合蛋白的数据,其是与本发明中分析的融合蛋白不同的融合蛋白,并且其具有不同的药代动力学特性,因此需要不同的给药方案以维持因子IX活性的某些谷值水平。

[0007] W02014/052490公开了用于以约10IU/kg至约200IU/kg的剂量向人受试者施用长效因子IXFc融合多肽的治疗方法,其中给药间隔为约每周一次或更长。W02015/095925公开了长效因子IX(包括与白蛋白连接的FIX(“rIX-FP”))的预防性静脉内给药方案的数据。25-75IU/kg的剂量被描述为以至少每周一次的间隔施用。在这些文献中没有公开关于在人中皮下施用长效FIX的数据。

[0008] 虽然Liles等人发表了用9.3U/kg血浆来源的FIX的单次皮下剂量给单一血友病B患者给药的报告(Thromb Haemost 1997;77(5):944-8),但关于对血友病B患者皮下注射FIX的临床数据非常有限。临床前研究已经显示了各种动物模型中显著不同的生物利用度数据。例如,本发明的临床前数据表明,取决于动物种类,皮下施用的rIX-FP的生物利用度为约13-50%。

[0009] 进行了对血友病B患者皮下施用后rIX-FP的PK的I期探索性研究。本发明首次表

明,长效FIX的哪种皮下给药方案能够用于治疗人患者的血友病B。由于皮下注射能够由患者自己或在儿童的情况下由家中的护理人员容易地施用,因此这些结果允许显著改善的血友病B管理,因为其允许更方便而痛苦更少地注射FIX。皮下施用还避免了静脉通路(venous access)装置中污染和血块形成的风险,否则可能会阻碍一些患有血友病的非常年幼的儿童得到足够的护理。

[0010] 具体而言,本发明涉及包含人FIX和人白蛋白的融合蛋白(“rIX-FP”),其中人FIX通过能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割的肽接头连接至人白蛋白的N末端,所述融合蛋白使用以下示例性限制性皮下给药方案:给药间隔为每天一次至每周一次的10-50IU/kg的剂量,优选给药间隔为每天一次、每2天或每3天的25IU/kg的剂量。已经显示这些皮下给药方案提供足够的生物利用度以维持血友病患者中临幊上显著的稳态FIX水平。

[0011] 这一进步是改善血友病B管理的重要的进一步步骤,因为通过允许患者容易地自我管理因子IX能够完全避免输注和静脉内注射。因此,本发明降低了由于可能污染的注射和输注设备而引起感染的风险,并且通过避免静脉内注射和输注所需的医院和医生就诊来增加患者的依从性。本发明还为具有静脉通路问题的患者提供治疗选择。

#### [0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了用于皮下施用rIX-FP的临幊相关给药方案。这些给药方案实现足以防止治疗期间的出血的FIX的谷值水平。在权利要求书中描述了根据本发明的实施方案。

[0014] 具体而言,本发明涉及融合蛋白,其包含

[0015] a) 人因子IX(FIX),和

[0016] b) 人白蛋白

[0017] 其用于在预防性给药方案中预防人患者的出血的方法中使用,其中人FIX通过肽接头与人白蛋白的N末端连接,所述肽接头能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割,并且其中所述融合蛋白待以约10-50IU/kg的剂量、使用约每天一次至约每周一次的给药间隔皮下施用至所述受试者。剂量可以是约10-20IU/kg,约20-30IU/kg,约30-40IU/kg,约40-约50IU/kg,约10IU/kg,约15IU/kg,约20IU/kg,约25IU/kg,约30IU/kg,约35IU/kg,约40IU/kg,约45IU/kg或约50IU/kg。在优选的实施方案中,剂量为约10IU/kg。在另一个优选的实施方案中,剂量为约20IU/kg。在进一步优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg。在又一个优选的实施方案中,剂量为50IU/kg。在这些实施方案中的任何一个中,给药间隔可以是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

[0018] 在一个优选的实施方案中,剂量为约10IU/kg,给药间隔为约一天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天或约每周两次。

[0019] 在另一个优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每天一次,或为约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

[0020] 在另一个优选的实施方案中,剂量为50IU/kg,给药间隔为约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

[0021] 在非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每天一次。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每2天。在又一个非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每3天。

[0022] 在非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每天一次,并且血浆

中的总FIX活性谷值水平维持在约8至约34IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中，剂量为约25IU/kg，给药间隔为约每天一次，并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约10至约30IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中，剂量为约25IU/kg，给药间隔为约每天一次，并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约15至约25IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中，剂量为约25IU/kg，给药间隔为约每天一次，并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约18至约22IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中，剂量为约25IU/kg，给药间隔为约每天一次，并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约17IU/dL。

[0023] 在备选的非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4至约17IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约6至约15IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约7至约12IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8IU/dL。

[0024] 在进一步非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约2.5至约12IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约3至约12IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4至约11IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4.5至约10IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约5IU/dL。

[0025] 在优选的实施方案中, FIX的血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约1%, 优选在整个给药间隔内高于基线至少约3%, 更优选在整个给药间隔内高于基线至少约5%, 更优选在整个给药间隔内高于基线至少约10%, 并且最优选在整个给药间隔内高于基线至少约15%的谷值水平。

[0026] 在优选的实施方案中,接头能够被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)切割。在特别优选的实施方案中,接头包含选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列。

[0027]

SEQ ID NO: 1

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

SEQ ID NO: 2

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

[0028] 在备选实施方案中,接头与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有90%的同一性。在另一个实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有80%的同一性。在又一个实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有70%的同一性。在又一个实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有60%的同一性。在进一步的实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有50%的同一性。

[0029] 优选地,本发明的融合蛋白与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少70%的同一性。

[0030] SEQ ID NO:3 (成熟rIX-FP)

[0031] FIX (aa 1-416)

[0032] 接头序列(加粗和加下划线的aa 416-433)

[0033] 白蛋白序列(aa 434-1018)

1	YNSGKLEEFVQGNLERECKMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGG	60
61	SCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAEN	120
121	QKSCEPAVPPCGRVSQSQTSLTRAETVFPDVYVNSTEAE <del>T</del> LDNITQSTQSFNDFTR	180
181	VVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDACGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEE	240
241	TEHTEQKRNVIIRIIPHNNYNAAINKYNHDIALLE <del>D</del> PLVLNSYVTPICIA <del>D</del> KEYTNIFL	300
301	KFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS	360
361	CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT <u>PVSQT</u>	420
421	<b><u>SKLTRAETVFPDV</u></b> DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVT	480
[0034]	481 EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE <del>PER</del> NECFLQHKD	540
	541 DNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTE	600
	601 CCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA <del>F</del> KAWAVARLSQRFPKAE	660
	661 FAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS	720
	721 HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF <del>L</del> GMFLY <del>E</del> YARRHPDYSVVLLL	780
	781 RLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVF <del>E</del> FKPLVEEPQNL <del>I</del> KQNC <del>E</del> LF <del>E</del> QLGEYKFQNAL	840
	841 L <del>V</del> RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP <del>C</del> AEDYLSVVLNQLCVLHEKT	900
	901 PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP <del>E</del> FTF <del>H</del> ADICTLSEKERQIKKQT	960
	961 ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL	1018

[0035] 融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少75%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少80%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少85%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少90%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少95%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少98%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少99%的同一性。在更优选的实施方案中,融合蛋白的序列具有SEQ ID NO:3所示的序列。

[0036] 在本发明的优选实施方案中,人患者患有血友病B。

[0037] 对于本发明的任何实施方案,提供融合蛋白用于以约100至400IU/ml,优选约100、200或400IU/ml的浓度施用。也可以提供融合蛋白用于以600IU/ml或1200IU/ml的浓度施用。

[0038] 本发明还包括包含半衰期延长的FIX(超过FIX终末半衰期的3倍)的融合蛋白,其

用于在用静脉内施用的FIX或静脉内施用的半衰期延长的FIX治疗的人患者中预防出血的方法中使用,其中半衰期延长的FIX蛋白质待皮下施用至受试者。另一方面,本发明包括包含半衰期延长的FIX(超过FIX终末半衰期的3倍)的融合蛋白,其用于预防人患者出血的组合治疗,其中患者首先用静脉内施用的FIX或静脉内施用的半衰期延长的FIX治疗,并在开始静脉内FIX治疗后将融合蛋白皮下施用至受试者。在W02015/095925和W02014/052490中描述了半衰期延长的FIX的静脉内施用。优选地,融合蛋白包含a)因子IX(FIX),和b)半衰期增强多肽(HLEP)。在非常优选的实施方案中,融合蛋白包含a)人因子IX(FIX)和b)人白蛋白,其中人FIX通过能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割的肽接头与人白蛋白的N-末端连接。皮下剂量优选以约10-50IU/kg的剂量、使用约每天一次至约每周一次的给药间隔施用。剂量可以是约10-20IU/kg,约20-30IU/kg,约30-40IU/kg,约40-约50IU/kg,约10IU/kg,约15IU/kg,约20IU/kg,约25IU/kg,约30IU/kg,约35IU/kg,约40IU/kg,约45IU/kg或约50IU/kg。在优选的实施方案中,剂量为约10IU/kg。在另一个优选的实施方案中,剂量为约20IU/kg。在进一步优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg。在另一个优选的实施方案中,剂量为50IU/kg。在这些实施方案中的任何一个中,给药间隔可以是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。在非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每天一次,约每2天一次,或约每3天一次。优选地,该方法涉及预防性给药方案。在另一个非常优选的实施方案中,融合蛋白包含a)人因子IX(FIX)和b)抗体的Fc部分,或a)人因子IX和b)XTEN。在所有上述融合蛋白中,人FIX和HELP可以直接连接或通过肽接头连接。在优选的实施方案中,接头能够被蛋白酶切割,其中蛋白酶优选为参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶。另一方面,本发明包括用于预防人患者出血的组合治疗的缀合的半衰期延长的人FIX(超过FIX终末半衰期的3倍),其中患者首先用静脉内施用的FIX或静脉内施用的缀合的半衰期延长的FIX治疗,并在开始静脉内FIX治疗后将缀合的半衰期延长的人FIX皮下施用至受试者。导致半衰期延长的缀合的非限制性实例包括聚乙二醇化或聚唾液酸化。在优选的实施方案中,静脉内施用的FIX或半衰期延长的FIX的施用将由随后的半衰期延长的FIX的皮下施用代替。在另一个优选的实施方案中,半衰期延长的FIX通过静脉内和皮下平行施用。

[0039] 本发明还包括在预防性给药方案中预防人患者的出血的方法,包括向受试者以约每天一次至约每周一次的给药间隔皮下施用约10-50IU/kg剂量的融合蛋白,所述融合蛋白包含

[0040] a)人因子IX(FIX),和

[0041] b)人白蛋白,

[0042] 其中人FIX通过肽接头与人白蛋白的N末端连接,所述肽接头能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割。剂量可以是约10-20IU/kg,约20-30IU/kg,约30-40IU/kg,约40-约50IU/kg,约10IU/kg,约15IU/kg,约20IU/kg,约25IU/kg,约30IU/kg,约35IU/kg,约40IU/kg,约45IU/kg或约50IU/kg。在优选的实施方案中,剂量为约10IU/kg。在另一个优选的实施方案中,剂量为约20IU/kg。在进一步优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg。在又一个优选的实施方案中,剂量为约50IU/kg。在这些实施方案中的任何一个中,给药间隔可以是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

[0043] 在一个优选的实施方案中,剂量为约10IU/kg,给药间隔为约一天一次,或约一周

四次,或约每2天,或约每3天或约每周两次。

[0044] 在另一个优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每天一次,或为约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

[0045] 在另一个优选的实施方案中,剂量为50IU/kg,给药间隔为约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。

[0046] 在非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每天一次。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每2天。在又一个非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每3天。

[0047] 在非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8至约34IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约10至约30IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约15至约25IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约18至约22IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每天一次,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约17IU/dL。

[0048] 在备选的非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4至约17IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约6至约15IU/dL。在又一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约7至约12IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,给药间隔为约每2天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约8IU/dL。

[0049] 在进一步非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约2.5至约12IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约3至约12IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4至约11IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约4.5至约10IU/dL。在另一个非常优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg,给药间隔为约每3天,并且血浆中的总FIX活性谷值水平维持在约5IU/dL。

[0050] 在优选的实施方案中,FIX的血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约1%,优选在整个给药间隔内高于基线至少约3%,更优选在整个给药间隔内高于基线至少约5%,更优选在整个给药间隔内高于基线至少约10%,并且最优选在整个给药间隔内高于基线至少约15%的谷值水平。

[0051] 在优选的实施方案中,接头能够被FIXa和/或FVIIa/组织因子(TF)切割。在特别优选的实施方案中,接头包含选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列。在备选实施方案中,接头与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有90%的同一性。在另一个实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有80%的同一性。在又一个实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有70%的同一性。在又一个实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID

NO:2之一具有60%的同一性。在进一步的实施方案中,其与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之一具有50%的同一性。

[0052] 优选地,本发明的融合蛋白与SEQ ID NO:3所示序列具有至少70%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少75%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少80%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少85%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少90%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少95%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少98%的同一性。融合蛋白的序列可以与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少99%的同一性。在更优选的实施方案中,融合蛋白的序列具有SEQ ID NO:3所示的序列。

[0053] 在本发明的优选实施方案中,人患者患有血友病B。

[0054] 对于本发明的任何实施方案,提供融合蛋白用于以约100至400IU/ml,优选约100、200或400IU/ml的浓度施用。也可以提供融合蛋白用于以600IU/ml或1200IU/ml的浓度施用。

[0055] 本发明还包括包含半衰期延长的FIX(超过FIX终末半衰期的3倍)的融合蛋白,其用于在用静脉内施用的FIX或静脉内施用的半衰期延长的FIX治疗的人患者中预防出血的方法中使用,其中半衰期延长的FIX蛋白质待皮下施用至受试者。另一方面,本发明包括包含半衰期延长的FIX(超过FIX终末半衰期的3倍)的融合蛋白,其用于预防人患者出血的组合治疗,其中患者首先用静脉内施用的FIX或静脉内施用的半衰期延长的FIX治疗,并在开始静脉内FIX治疗后将融合蛋白皮下施用至受试者。在W02015/095925和W02014/052490中描述了半衰期延长的FIX的静脉内施用。优选地,融合蛋白包含a)因子IX(FIX),和b)半衰期增强多肽(HLEP)。在非常优选的实施方案中,融合蛋白包含a)人因子IX(FIX)和b)人白蛋白,其中人FIX通过能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割的肽接头与人白蛋白的N-末端连接。皮下剂量优选以约10-50IU/kg的剂量、使用约每天一次至约每周一次的给药间隔施用。剂量可以是约10-20IU/kg,约20-30IU/kg,约30-40IU/kg,约40-约50IU/kg,约10IU/kg,约15IU/kg,约20IU/kg,约25IU/kg,约30IU/kg,约35IU/kg,约40IU/kg,约45IU/kg或约50IU/kg。在优选的实施方案中,剂量为约10IU/kg。在另一个优选的实施方案中,剂量为约20IU/kg。在进一步优选的实施方案中,剂量为约25IU/kg。在又一个优选的实施方案中,剂量为50IU/kg。在这些实施方案中的任何一个中,给药间隔可以是约每天一次,或约每周四次,或约每2天,或约每3天,或约每周两次,或约每5天,或约每周一次。在非常优选的实施方案中,剂量为25IU/kg,给药间隔为约每天一次,约每2天一次,或约每3天一次。优选地,该方法涉及预防性给药方案。在另一个非常优选的实施方案中,融合蛋白包含a)人因子IX(FIX)和b)抗体的Fc部分,或a)人因子IX和b)XTEN。在所有上述融合蛋白中,人FIX和HELP能够直接连接或通过肽接头连接。在优选的实施方案中,接头能够被蛋白酶切割,其中蛋白酶优选为参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶。另一方面,本发明包括用于预防人患者出血的组合治疗的缀合的半衰期延长的人FIX(超过FIX终末半衰期的3倍),其中患者首先用静脉内施用的FIX或静脉内施用的缀合的半衰期延长的FIX治疗,并在开始静脉内FIX治疗后将缀合的半衰期延长的人FIX皮下施用至受试者。导致半衰期延长的缀合的非限制性实例包括聚乙二醇化或聚唾液酸化。在优选的实施方案中,静脉内施用的FIX或半衰期延长的FIX

的施用将由随后的半衰期延长的FIX的皮下施用代替。在另一个优选的实施方案中,半衰期延长的FIX通过静脉内和皮下平行施用。

## 附图说明

- [0056] 图1:兔中人FIX抗原(rIX-FP)的血浆水平(平均值±SD,n=3/时间点),线性标度。
- [0057] 图2:猪中人FIX抗原(rIX-FP)的血浆水平(平均值±SD,n=1-3/时间点),线性标度。
- [0058] 图3:以125和500IU/kg的剂量水平静脉内和皮下施用至食蟹猴后的rIX-FP的平均血浆浓度。
- [0059] 图4:以500IU/kg的剂量水平皮下施用至食蟹猴后的**BeneFIX®**和rIX-FP的平均血浆浓度。
- [0060] 图5A:在四个不同的人患者(38、39、40和50)中通过ID(群组1-25IU/kg)皮下剂量的rIX-FP的未校正的FIX活性相对时间的图。
- [0061] 图5B:在五个不同的人患者(38、39、16、17和21)中通过ID(群组2-50IU/kg)皮下剂量的rIX-FP的未校正的FIX活性相对时间的图。
- [0062] 图6A:在四个不同的人患者(38、39、40和50)中通过ID(群组1-25IU/kg)皮下剂量的rIX-FP的校正的FIX活性相对时间的图。针对给药前FIX水平的指数下降校正FIX活性水平。一旦得到校正,任何负值都设置为0.01。
- [0063] 图6B:在五个不同的人受试者(38、39、16、17和21)中通过ID(群组2-50IU/kg)皮下剂量的rIX-FP的校正的FIX活性相对时间的图。针对给药前FIX水平的指数下降校正FIX活性水平。一旦得到校正,任何负值都设置为0.01。
- [0064] 图7:群组3,25IU/kg,每3天重复剂量,在三个不同的人患者(38、39、40)中观察到的FIX活性相对时间的图。灰色阴影是第一剂量和最后一次重复剂量15之间的时间间隔。
- [0065] 图8A:每天25IU/kg的FIX活性(IU/dL)相对时间的模拟图。
- [0066] 图8B:每2天25IU/kg的FIX活性(IU/dL)相对时间的模拟图。
- [0067] 图8C:每3天25IU/kg的FIX活性(IU/dL)相对时间的模拟图。
- [0068] 图8D:用来自群组3(n=3)的施用第15次剂量后观察到的PK数据覆盖的每3天25IU/kg的FIX活性(IU/dL)相对时间的模拟图。
- [0069] 发明详述
- [0070] 如本文所用,“预防性治疗”、“预防性给药方案”、“预防出血(*prevention of bleeding*)”或“预防出血(*preventing bleeding*)”意指在一段时间内向人患者施用多剂量的因子IX融合蛋白以增加患者血浆中的因子IX活性水平。优选地,增加的水平足以降低自发性出血的发生率或预防在不可预见的损伤的情况下出血。预防性治疗减少或预防出血事件,例如,在按需治疗中描述的那些。预防性治疗可以是固定的或可以是个体化的,如“给药间隔”中所讨论的,例如,以补偿患者间的可变性。
- [0071] 如本文所用,“给药间隔”意指在施用至人患者的多个剂量之间经过的时间量。使用rIX-FP的本发明的方法中的给药间隔可以是相等量(IU/kg)的不含白蛋白的所述因子IX(即,由所述FIX组成的多肽)所需的给药间隔的至少约一点五至八(1.5-8)倍。施用本发明的因子IX-白蛋白融合蛋白时的给药间隔可以是相等量的不含白蛋白的所述因子IX所需的

给药间隔的至少约一点五至八 (1.5-8) 倍。给药间隔可以是相等量的不含白蛋白的所述因子IX (或由所述因子IX组成的多肽) 所需的给药间隔的至少约一点五至八 (1.5-8) 倍。

[0072] 如本文所用,“中值剂量”意指研究人患者的一半使用高于该剂量,并且研究人患者的一半使用低于该剂量。“平均剂量 (mean dose)”意指平均的剂量 (average dose) (通过将所有剂量相加并除以剂量总数来计算)。对于给定剂量,“约”意指指示的剂量加上或减去该指示剂量的1、2、5、10、15或20%。或者,对于给定剂量,“约”意指加上或减去1IU/kg。对于约每天一次的给药间隔,“约”意指加上或减去6小时。对于约每周四次或每两天的给药间隔,“约”意指加上或减去8小时。对于约每周两次或每3天的给药间隔,“约”意指加上或减去12小时。对于约每5天的给药间隔,“约”意指加上或减去15小时。对于约每周一次的给药间隔,“约”意指加上或减去18小时。

[0073] “总FIX活性谷值水平”意指以IU/dL测量的FIX活性的血浆水平谷值水平。这可以使用直接凝血测定如aPTT、PT或凝血酶生成测定来确定。然而,还包括其他测定,例如应用于特定凝血因子的生色测定。此类测定或相应试剂的实例是使用相应的凝血因子缺乏血浆 (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乏血浆的凝血酶生成测定试剂盒 (Technoclone, Thrombinoscope), 生色测定如Biophen因子IX (Hyphen BioMed), **Staclot®** FVIIa-rTF (Roche Diagnostics GmbH), **Coatest®** 因子VIII:C/4 (Chromogenix) 或其它。FIX活性优选通过一步aPTT测定法测量,其中Pathromtin SL用作活化剂。对于总FIX活性谷值水平,“约”意指加上或减去1IU/dL。

[0074] “基线”意指给定患者中优选以IU/dL表示或以健康人中FIX活性的%表示的FIX活性水平,其定义为100IU/dL或100%。在严重的血友病B中,给定患者的基线水平为非常低至零或几乎为零,而在中度血友病中,患者的基线可能更高,例如高于1%、高于2%或高于3%或高于4%,而在轻度血友病中,患者基线可能高于健康人中FIX活性浓度的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缓慢清除,即它返回到个体基线水平。在本研究中,基线水平由于先前IV给药的残余FIX水平而较高,其通过减去给药前水平的指数下降来校正,以达到预期的内源水平。

[0075] “谷值水平”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。由于患者间可变性,谷值水平通常意指中值,这意指一半的研究患者具有更高的谷值水平,一半的研究患者具有更低的谷值水平。尽管使用中值更常见,但是PK数据的谷值水平也可以计算为平均值,其通过将所有患者的值相加并除以患者数来确定。谷值水平优选高于1%,更优选高于2%,还更优选高于3%,还更优选高于4%,还更优选高于5%,还更优选高于6%,还更优选高于7%,还更优选高于8%,还更优选高于9%,还更优选高于10%,还更优选高于11%,还更优选高于12%,还更优选高于13%,还更优选高于14%,甚至更高更优选高于15%。进一步优选的谷值水平高于20%,高于25%,高于30%,高于35%,高于40%,高于45%,高于50%,高于55%,高于60%,高于65%,高于70%,高于75%,高于80%,高于85%,高于90%,高于95%。

[0076] “将总FIX活性的血浆水平维持在至少“约”某一浓度的谷值意指,在需要FIX的患者的某一给药方案期间,血浆中的总FIX活性不会低于所述浓度,其中正常人血浆中的总

FIX活性浓度为1IU/ml或100IU/dL，并且其中FIX活性优选使用经验证的一步凝血方法测定。FIX活性是FIX生物活性。

[0077] “将FIX的血浆水平维持在约”某一第一浓度“和约”另一某一第二浓度“之间的谷值”意指，在需要FIX的患者的某一给药方案期间，血浆中的FIX活性不会低于所述第一浓度，并且不会超过所述第二浓度，其中正常人血浆中的FIX活性浓度为1IU/ml或100IU/dL，并且其中FIX活性优选使用经验证的一步凝血方法测定。FIX活性是FIX生物活性。

[0078] 如本文使用的“约”某一谷值水平意指平均的谷值水平。对于给定的谷值水平，“约”意指所示谷值水平加上或减去所示谷值水平的1、2、5、10、15、20或30%。或者，对于给定的谷值水平，“约”意指加上或减去1IU/dL。

[0079] 特别是在严重的血友病B中，必须注意FIX活性浓度不低于最低水平以预防出血。该最低水平称为期望的谷值水平，其由内源水平加上施用的FIX的最低附加水平组成。在严重的血友病B患者中，当基线几乎为零时，高于基线1%的谷值水平意指健康人中FIX活性浓度的约1%的FIX活性浓度。在具有健康人中FIX活性浓度的3%FIX活性的基线水平的中度血友病B患者中，高于基线1%的谷值水平意指健康人中FIX活性浓度的约4%的FIX活性浓度。

[0080] 在本发明中，给药间隔可以是约每天一次，约每周四次，约每2天，约每3天，约每周两次，约每5天，或约每周一次。这意指间隔可以是约每1至7天一次，包括约每隔一天，约每周5次，约每2-4天一次，约每周3次，约每4-6天一次，约每5天一次，约每6-8天一次，约每7天一次。特别地，考虑了每天约一次、约每周四次、约每2天、约每3天、约每周两次、约每5天和约每周一次的给药间隔。最优选的给药间隔是约每天一次，每2天一次和每3天一次。

[0081] 或者，给药间隔可以是基于药代动力学数据或关于该患者的其他信息为每个患者确定的个体化间隔。个体化剂量/给药间隔组合可以与前面段落中的固定间隔方案的那些相同或可以不同。该方案可以最初处于固定的给药间隔，然后它可以改变为个体化的给药间隔。或者，该方案可以最初处于固定的剂量(IU/kg)和给药间隔，然后它可以改变为使用固定的剂量的个体化的给药间隔。该方案也可以最初处于固定的给药间隔和剂量(IU/kg)，然后它可以改变为使用相同固定的给药间隔的个体化的剂量。

[0082] 对于约每天一次、约每周4次、约每2天、约每3天和约每周两次的给药方案，考虑了约10-15IU/kg、约15-20IU/kg、约10IU/kg、约15IU/kg和约20IU/kg的治疗剂量。

[0083] 关于约每天一次、每周4次、或约每2天、或约每3天、约每周两次、或约每5天和约每周一次的给药方案，考虑了约20-25IU/kg，约25-30IU/kg，约30-35IU/kg，约35-40IU/kg，40-45IU/kg，约45-50IU/kg，约20IU/kg，约25IU/kg，约30IU/kg，约35IU/kg，约40IU/kg，约45IU/kg和约50IU/kg的治疗剂量。

[0084] 本发明的优选剂量和给药间隔如下：

[0085] 约每天一次的约10-25IU/kg，约每周4次的约10-25IU/kg，约每2天的约10-25IU/kg，约每3天的约10-25IU/kg，约一周两次的约10-25IU/kg，约每天一次的约10IU/kg，约每周4次的约10IU/kg，约每2天的约10IU/kg，约每3天的约10IU/kg，约每天一次的约20IU/kg，约每周4次的约20IU/kg，约每2天的约20IU/kg，约每3天的约20IU/kg，约每周两次的约20IU/kg，约每5天的约20IU/kg，约每周一次的约20IU/kg，约每天的约25-50IU/kg，约每周4次的约25-50IU/kg，约每2天的约25-50IU/kg，约每3天的约25-

50IU/kg, 约每周两次的约25-50IU/kg, 约每5天的约25-50IU/kg, 约每周一次的约25-50IU/kg, 约每天一次的约25IU/kg, 约每周4次的约25IU/kg, 约每2天的约25IU/kg, 约每3天的约25IU/kg, 约每周两次的约25IU/kg, 约每5天的约25IU/kg, 约每周一次的约25IU/kg, 约每天一次的约50IU/kg, 约每周4次的约50IU/kg, 约每2天的约50IU/kg, 约每3天的约50IU/kg, 约每周两次的约50IU/kg, 约每5天的约50IU/kg, 约每周一次的约50IU/kg。

[0086] “约每周一次”包括约每6至8天一次和约每7天一次。

[0087] 25IU/kg的剂量是最优选的剂量, 给药间隔为每天一次、每2天一次或每3天一次。

[0088] 如实施例1所示, 皮下rIX-FP的临床前生物利用度数据在动物模型之间差异很大(例如, 在猴中, 对于500IU/kg和125IU/kg分别为9.29%和17%, 而在兔中, 对于500IU/kg和150IU/kg分别为43%和55%)。实施例2中的临床数据首次显示了哪种皮下剂量的长效FIX可有效控制人患者的血友病B。

[0089] 本发明包括实施方案, 其中在施用10IU/kg rIX-FP剂量后, FIX活性的中值血浆水平在每天一次、每周4次、每2天或每3天、每周两次的整个给药间隔内维持高于基线至少约5%的谷值。在另一个实施方案中, 在施用25IU/kg或50IU/kg rIX-FP剂量后, FIX活性的中值血浆水平在每天一次、每周4次、每2天或每3天、每周两次、每5天或每周一次的给药间隔内维持高于基线至少约5%的谷值。

[0090] 本发明还包括实施方案, 其中约每天施用10IU/kg rIX-FP剂量, 在整个给药间隔内维持高于基线至少约7%的FIX活性的中值血浆水平。在另一个实施方案中, 其中约每周四次施用10IU/kg rIX-FP剂量, 在整个给药间隔内维持高于基线至少约4%的FIX活性的中值血浆水平。在另一个实施方案中, 其中约每2天施用10IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约3%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每3天施用10IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约2%的谷值。在另一个实施方案中, 其中约每周两次施用10IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约2%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每5天施用10IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约1.5%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每周一次(例如, 每7天)施用10IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约1%的谷值。

[0091] 在另一个实施方案中, 其中约每天施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约17%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每周4次施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约10%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每2天施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平维持至少约8%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每3天一次施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平维持至少约5%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每周两次施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约4%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中约每5天一次施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平维持至少约3%的谷值。在进一步的实施方案中, 其中每周一次(例如, 每7天)施用25IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约2%的谷值。

[0092] 在进一步的实施方案中,其中约每天施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约20%的谷值。在另一个实施方案中,其中约每周4次施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约12%的谷值。在进一步的实施方案中,其中约每2天一次施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平维持至少约10%的谷值。在进一步的实施方案中,其中约每3天一次施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平维持至少约6%的谷值。在又一个实施方案中,其中约每周两次施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约5%的谷值。在进一步的实施方案中,其中约每5天一次施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平维持至少约4%的谷值。在又一个实施方案中,其中约每周一次(例如,7天)施用50IU/kg rIX-FP剂量, FIX活性的中值血浆水平在整个给药间隔内维持高于基线至少约2%的谷值。

[0093] 或者,在这些实施方案中, FIX活性的血浆水平可以计算为平均值。

[0094] 特别地,本发明提供了包含人FIX和人白蛋白的融合蛋白的预防性给药方案,其中人因子IX(FIX)部分与人白蛋白连接,其中人FIX通过能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割的肽接头连接到人白蛋白的N末端,其中融合蛋白待以约10-50IU/kg的剂量、使用约每天一次至约每周一次的给药间隔皮下施用至受试者。

[0095] 具有允许在FIX活化之前切割的接头的rIX-FP融合蛋白显示由于白蛋白引起的增加的FIX的半衰期,但由于切割在出血事件之前发生,因此活化的FIX的半衰期在活化之前降低。另一方面,如果在FIX活化后发生切割,则白蛋白增加FIX的半衰期,但活化的FIX仍与白蛋白融合,因此其活性低。

[0096] 在本发明的意义上,凝血相关模式中的蛋白水解切割是由于至少一种凝血因子或凝血辅助因子的活化而发生的任何蛋白水解切割。几乎与接头肽的蛋白水解切割平行地活化凝血因子。活化可以例如通过凝血因子的蛋白水解切割或通过结合辅因子发生。白蛋白增加血液中FIX的半衰期直至出血事件发生,出血事件同时活化FIX并从白蛋白切割FIX。切割使多肽免于由白蛋白引起的任何受活性损害的空间位阻,从而允许产生保留FIX的高摩尔比活性的融合蛋白。然后,由于白蛋白的丢失,切割的FIX迅速从血液中清除。与其不能切割的对应物相比,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的不能切割的融合蛋白相比,需要较少的rIX-FP来提供治疗效果。

[0097] 根据本发明的优选的融合蛋白是在至少一种凝血相关测定中与通过具有氨基酸序列GGGGGGV (SEQ ID NO:4)的不能切割接头连接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)相比,具有增加至少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。更优选的是在至少一种可用的不同凝血相关测定中摩尔比活性增加至少50%的融合蛋白,甚至更优选的是摩尔比活性增加至少100%的那些融合蛋白。

[0098] 在进一步的实施方案中,接头肽包含多于一种蛋白酶的切割位点。这能够通过能够由不同蛋白酶在相同位置切割的接头肽或通过提供两个或更多个不同切割位点的接头肽来实现。可能存在这样的有利情况,其中治疗性融合蛋白必须通过蛋白水解切割来活化以实现酶活性,并且其中不同的蛋白酶可以有助于该活化步骤。FIX的活化可以通过FXIa或FVIIa/组织因子(TF)实现。在优选的实施方案中,接头能够被FIXa和/或FVIIa/组织因子

(TF) 切割。

[0099] rIX-FP (rFIX-白蛋白融合蛋白) 在W02015/095925中描述为具有SEQ ID NO:3所示的序列。如通过5.3倍更长的半衰期 ( $t_{1/2}$ )、7倍降低的CL和7倍更高的AUC所显示的, 它与rFIX(例如, **BeneFIX®**)相比具有延长的血浆循环。此外, 当比较rIX-FP的药代动力学参数与 **Alprolix®** FDA处方信息中 FIX-Fc 的相应药代动力学数据时, 与 rIX-Fc (**ALPROLIX®**)相比, rIX-FP具有约3.8倍更高的AUC0-inf、约3.7倍降低的CL/BW、约26%更高的增量回收率、约3.2倍更少的分布体积和增加了约19%的药物平均停留时间。

[0100] 预防是通过注射因子浓缩物来预防预期的出血的治疗。根据凝血因子水平>1IU/dl (>1%) 的中度血友病患者很少经历自发性出血并且具有好得多的关节功能维持的观察结果认为实现了预防。因此, FIX活性维持在高于1%以防止出血和关节破坏的预防应该是维持正常肌肉骨骼功能的治疗目标(GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF HEMOPHILIA, 第2版, Treatment Guidelines Working Group代表World Federation of Hemophilia (WFH) 制定)。

[0101] 本发明涉及包含人FIX和人白蛋白的融合蛋白的临床有效的皮下给药方案, 其用于在预防性给药方案中预防人患者的出血的方法中使用。这些发现进一步改善了血友病预防性治疗, 因为其允许血友病患者自我施用FIX, 不需要医院或医生就诊。

[0102] 在优选的实施方案中, FIX的血浆水平在整个给药间隔内维持在高于基线至少约0.5%, 至少约1%, 至少约2%, 至少约3%, 至少约4%, 至少约5%, 至少约7%, 至少约8%, 至少约10%, 至少约12%, 至少约15%, 至少约18%, 至少约20%, 或至少约30%的谷值, 优选在整个给药间隔内维持在高于基线8至34%, 或4至17%或2.5至12%的谷值。

[0103] 人FIX

[0104] 人FIX是维生素K依赖性多肽组中的一个成员, 其是分子量为57kDa的单链糖蛋白, 其作为415个氨基酸的无活性酶原由肝细胞分泌到血流中。它含有位于多肽的N-末端Gla结构域的12个  $\gamma$ -羧基-谷氨酸残基。Gla残基需要维生素K才能进行生物合成。在Gla结构域之后, 存在两个表皮生长因子结构域、一个活化肽和一个胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶结构域。FIX的进一步翻译后修饰包括羟基化(Asp 64), N-型糖基化(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)。

[0105] 通过活化肽在Arg145-Ala146和Arg180-Va1181处的蛋白水解, 将FIX转化为其活性形式(因子IXa), 导致形成两条多肽链, N-末端轻链(18kDa)和C-末端重链(28kDa), 其由一个二硫桥连接在一起。因子IX的活化切割可以在体外例如通过因子XIa或因子VIIa/TF实现。因子IX以5-10 $\mu$ g/ml的浓度存在于人血浆中。发现因子IX在人中的终末血浆半衰期为约15至18小时(White GC等人1997. Thromb Haemost. 78:261-265; Ewenstein BM等人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)。

[0106] 人白蛋白

[0107] 上文已经描述了白蛋白、白蛋白家族成员和免疫球蛋白及其片段或衍生物作为半衰期增强多肽(HLEP)的实例。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。

[0108] 如本文所用,“白蛋白”统称为白蛋白多肽或氨基酸序列,或白蛋白片段或变体,其具有白蛋白的一种或多种功能活性(例如生物活性)。特别地,“白蛋白”意指人白蛋白或其片段,尤其是成熟形式的人白蛋白。例如,白蛋白能够具有如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以包含全长HA序列,或可以包括能够稳定或延长治疗活性的一个或多个其片段。此类片段的长度可以是10个或更多个氨基酸,或可以包括来自HA序列的约15、20、25、30、50或更多个连续氨基酸,或可以包括HA的部分或全部特定结构域。

[0109] 本发明的白蛋白融合蛋白的白蛋白部分可以是天然或人工的正常HA的变体。本发明的融合蛋白的治疗性多肽部分也可以是如本文所述的相应治疗性多肽的变体。术语“变体”包括插入、缺失和取代,无论其是保守的或非保守的,天然的或人工的,其中这种变化基本上不改变赋予治疗性多肽的治疗活性的活性位点或活性结构域,如在通过引用整体并入本文的US2008260755A1中描述的。

[0110] 本发明特别涉及融合蛋白,其包含a)人因子IX(FIX)和b)人白蛋白,其中人FIX通过肽接头与人白蛋白的N-末端连接,所述肽接头能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割。与未与白蛋白连接的凝血因子相比,该融合蛋白具有增加的体内半衰期,并且与相应的具有不能切割接头的融合蛋白相比,在至少一种可用的不同凝血相关测定中,该融合蛋白具有至少25%更高的摩尔比活性。

[0111] 上述定义中的“人因子IX”包括具有天然氨基酸序列的多肽(包括任何天然多态性)。它还包括具有轻微修饰的氨基酸序列的多肽,例如,包括末端氨基酸缺失或添加的修饰的N-末端或C-末端,只要这些多肽基本上保留相应治疗性多肽的活性。包括的变体在一个或多个氨基酸残基上不同于野生型序列。这种不同的实例可包括N-末端和/或C-末端的一个或多个氨基酸残基(例如优选1至30个氨基酸残基)的截短,或在N-末端和/或C-末端添加一个或多个额外残基,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)疏水性氨基酸,和(6)芳香族氨基酸。这种保守取代的实例如下表所示。

[0112] 表1:氨基酸的保守取代

(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	
(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	

[0113] [0114] 本发明的融合蛋白的体内半衰期(通常确定为终末半衰期或 $\beta$ -半衰期)通常比非融合多肽的体内半衰期高至少约25%,优选至少约50%,更优选超过100%。

[0115] 与没有能切割的接头的相应融合蛋白相比,本发明的融合蛋白具有至少25%,优选至少50%,更优选至少100%增加的摩尔比活性。

[0116] 在这方面,摩尔比活性(或特别是在此考虑的摩尔比凝血相关活性)定义为每摩尔(或例如nmole)感兴趣的治疗性多肽或治疗性融合蛋白所表达的活性。摩尔比活性的计算允许直接比较不受所研究多肽的不同分子量或光密度影响的不同构建体的活性。摩尔比活性可以如下表2中对FIX和rIX-FP融合蛋白所示例的进行计算。

[0117] 表2:如纯化的FIX-HSA融合蛋白所示的摩尔比活性的计算

产物	OD <sub>(280nm, 1%)</sub>	MW	活性/Vol/OD <sub>280</sub> (IU/L/OD <sub>280</sub> )	摩尔光密度( 1 mol/L的OD <sub>(280)</sub> )	摩尔比活性的计算 (IU/mol)
FIX	13.3 <sup>1)</sup>	57 000	针对产物测量的	75810 (= MW x OD <sub>(280, 1%)</sub> /10)	= (活性/Vol/OD <sub>280</sub> ) x (1 mol/L的OD <sub>280</sub> )
白蛋白	5.7 <sup>2)</sup>	66 300		37791 (= MW x OD <sub>(280, 1%)</sub> /10)	
FIX-FP			针对产物测量的	113601 (= FIX和 白蛋白的摩尔光 密度的总和)	= (活性/Vol/OD <sub>280</sub> ) x (1 mol/L的OD <sub>280</sub> )

[0119] 1) R.G.Di Scipio等人,Biochem.16:6698-706 (1977)

[0120] 2) C.Chaudhury等人J.Exp.Med.197 (3) :315-322 (2003)

[0121] 为了确定摩尔比凝血相关活性,可以使用确定与凝血过程相关的酶或辅因子活性的任何测定。

[0122] 因此,本发明意义上的“凝血相关测定”是确定与凝血过程相关的酶或辅因子活性的任何测定,或能够确定内源性或外源性凝血级联已被活化的任何测定。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,例如应用于特定凝血因子的生色测定。此类测定或相应试剂的实例是使用相应的凝血因子缺乏血浆(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乏血浆的凝血酶生成测定试剂盒(Technoclone,Thrombinoscope),生色测定如Biophen因子IX(Hyphen BioMed),**Staclot®** FVIIa-rTF (Roche Diagnostics GmbH),**Coatest®** 因子VIII:C/4 (Chromogenix) 或其它。

[0123] 出于本发明的目的,认为上述任何一种测定或等同凝血相关测定中的增加显示出摩尔比活性的增加。例如,25%的增加是指任何上述或等同测定中25%的增加。

[0124] 为了确定治疗性融合蛋白是否落入本发明的范围,比较这些蛋白质的摩尔比活性的标准是其中相应的凝血因子和人白蛋白通过具有氨基酸序列GGGGGGV (SEQ ID NO:4) 的不能切割的接头连接的构建体。

[0125] 对于FIX,aPTT测定通常用于测定凝血活性。然而,可以应用其他凝血相关测定或测定原理来确定FIX的摩尔比活性。

[0126] 虽然期望未活化的凝血因子具有高的体内回收率和长的半衰期,但是有利的是限制凝血因子在其活化或其辅因子活化后的半衰期以避免血栓前风险。因此,在开始凝血过程后,应再次降低活性凝血因子的半衰期。这能够通过增强凝血相关模式中的失活或通过消除凝血因子来实现。

[0127] 根据本发明的失活意指治疗性多肽的活性降低,其能够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已知的进一步蛋白水解切割(例如在FVIII和FV的情况下)引起。

[0128] 活化的治疗性融合蛋白的失活速率定义为活性下降(例如通过与抑制剂反应或通过蛋白水解失活)的速率。失活速率可以通过在存在生理量的该凝血因子的抑制剂的情况下随时间跟随活化的凝血因子的摩尔比活性来测量。

[0129] 或者,可以在将活化的产物施用至动物之后,然后使用活性和抗原测定在适当的时间范围测试血浆样品来确定失活速率。

[0130] 当对于治疗性融合蛋白,需要确定这些蛋白质是否落入本发明的范围时,与这些治疗性蛋白质的失活速率相比较的标准是其中相应的凝血因子和人白蛋白通过具有氨基酸序列GGGGGGV (SEQ ID NO:4) 的不能切割的接头结合的构建体。

[0131] 活化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。可通过测量皮下施用后活化的治疗性融合蛋白的药代动力学来确定消除速率。通过使用抗原测定,能够确定通过从循环中直接除去的消除。可以另外使用活性测定来确定失活速率。

[0132] 当对于治疗性融合蛋白,需要确定这些蛋白质是否落入本发明的范围时,与这些治疗性蛋白质的消除速率相比较的标准是其中相应的凝血因子和人白蛋白通过具有氨基酸序列GGGGGGV (SEQ ID NO:4) 的不能切割的接头结合的构建体。

[0133] 根据本发明,融合蛋白包含通过肽接头与人白蛋白的N-末端连接的人FIX,所述肽接头能够被参与凝血或由凝血酶活化的蛋白酶切割。接头应该是非免疫原性的并且应该具有足够的柔性以允许被蛋白酶切割。

[0134] 能切割的接头优选包含衍生自a)待施用的治疗性多肽的序列本身(如果其含有在治疗性多肽的活化期间蛋白水解切割的蛋白水解切割位点),b)该治疗性多肽的底物多肽,或c)被蛋白酶切割的底物多肽,所述蛋白酶通过治疗性多肽的直接或间接参与而活化或形成。

[0135] 更优选的实施方案中的接头区包含待施加的治疗性多肽的序列,其应导致表达的融合蛋白的新抗原性质的风险降低。

[0136] 在优选的实施方案中,接头序列来自FIX的活化区的序列,来自FIX的任何底物如FX或FVII的切割区,或来自被蛋白酶(其活化FIXa参与其中)切割的任何底物多肽的切割区。

[0137] 在非常优选的实施方案中,接头肽衍生自FIX本身。在进一步优选的实施方案中,接头肽衍生自FX或FVII。在更进一步优选的实施方案中,接头序列包含两个能够被FXIa或FVIIa/TF(两种生理学相关的FIX活化剂)切割的切割序列。

[0138] 所述接头的变体和片段也包括在本发明中,只要接头仍能够被切割接头的一种或多种蛋白酶切割。术语“变体”包括保守或非保守的插入、缺失和取代。

[0139] 药物组合物和施用方式

[0140] 本发明的融合蛋白能够掺入到适合皮下施用的药物组合物中。此类组合物通常包含蛋白质和药学上可接受的载体。如本文所用,“药学上可接受的载体”旨在包括与药学皮下施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。用于皮下应用的溶液或悬浮液能够包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水,盐溶液,不挥发油,聚乙二醇,甘油,丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸

甲酯；抗氧化剂，如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂如乙酸盐，柠檬酸盐或磷酸盐，以及张度调节剂，如氯化钠或葡萄糖。合适的载体描述于最新版本的Remington's Pharmaceutical Sciences(本领域的标准参考文本，其通过引用并入本文)中。这样的载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水，盐水，林格氏溶液，右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒介物如不挥发油。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则考虑在组合物中使用它们。补充的活性化合物也能够掺入到组合物中。能够用酸或碱如盐酸或氢氧化钠调节pH。肠胃外制剂能够封装在由塑料或玻璃制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。作为皮下注射的施用是优选的施用途径。

[0141] 适于注射使用的药物组合物包括无菌含水溶液(当能够溶于水时)或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。对于皮下施用，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，组合物必须是无菌的并且应该是流动性的以便存在容易注射的能力。它必须在制造和储存条件下稳定，并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体能够是溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如通过使用包衣诸如卵磷脂、通过在分散体的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂，能够维持适当的流动性。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，能够实现防止微生物的作用。在许多情况下，在组合物中包含等张剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠将是优选的。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，能够实现注射组合物的延长吸收。

[0142] 无菌注射溶液可以通过将所需量的活性化合物(例如rIX-FP)根据需要与上面列举的成分中的一种或组合掺入到适当的溶剂中，然后过滤灭菌来制备。通常，通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散体，所述无菌媒介物含有基础分散介质和所需的来自上面列举的那些成分的其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分的粉末。

[0143] 注射用制剂能够含有治疗有效量的因子IX(FIX)融合蛋白(例如rIX-FP)，该量可由技术人员确定。特别地，因子IX(FIX)融合蛋白(即rIX-FP)可以以约100至2000IU/ml的浓度施用。例如，融合蛋白可以被提供用于以约100至400IU/ml，或约100、200或400IU/ml的浓度施用。融合蛋白也可以被提供用于以约600IU/ml, 800IU/ml, 1000IU/ml, 1200IU/ml, 1400IU/ml, 1600IU/ml, 1800IU/ml或2000IU/ml施用。融合蛋白也可以被提供用于以约2500IU/ml, 3000IU/ml, 3500IU/ml或4000IU/ml施用。

[0144] 特别有利的是以剂量单位形式配制药物组合物，例如注射用组合物，以便于施用和剂量的均匀性。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗患者的单位剂量的物理上离散的单位；每个单位含有预定量的活性化合物，其经计算可与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果。由活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果决定和直接依赖于剂量单位形式的规格。

[0145] 药物组合物能够与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。

[0146] 通过参考以下实施例将更清楚地理解本发明，这些实施例仅出于举例说明的目的

而包括在本文中，并不意图限制本发明。本文提及的所有专利和出版物均明确地通过引入并入本文。

## 实施例

[0147] 实施例1-临床前研究

[0148] A. 单次皮下或静脉内注射兔后rIX-FP和 **Berinin®P** 的药代动力学

[0149] 该研究的目的是研究皮下施用至兔后rIX-FP的生物利用度，并进一步与市售的血浆来源的人凝血因子IX (FIX) 产品 (即 **Berinin®P**) 比较皮下药代动力学曲线。

[0150] 四组兔 (每组包含3只雌性动物) 分别接受150IU/kg (rIX-FP) 和500IU/kg (rIX-FP 和 **Berinin®P**) 剂量水平的单次皮下 (s.c.) 剂量，或150IU/kg (rIX-FP) 剂量水平的单次静脉内 (i.v.) 剂量。此后，抽取血样长达10天。使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 技术进行兔血浆样品中人FIX抗原浓度的后续测定。

[0151] 该研究的结果表明，在兔中，皮下注射后rIX-FP被转运到血管系统。在s.c. 施用150和500IU/kg rIX-FP之后观察到人FIX血浆水平的剂量依赖性增加，在给药后24和32小时之间达到峰值血浆水平(图1)。因此，s.c. 应用后rIX-FP的各自生物利用度对于150IU/kg 为55%，对于500IU/kg组为43% (48% = 几何平均值)。与 **Berinin®P** 的s.c. 应用相比，在500IU/kg rIX-FP的s.c. 施用后的人FIX血浆水平更高且较慢地降低。因此，s.c.rIX-FP给药 (1.01IU/mL) 后的最大人FIX血浆水平是 **Berinin®P** 给药后 (0.17IU/mL) 的约6倍，其在约10小时后已达到峰值血浆水平。此外，s.c. 施用rIX-FP后的AUC是 **Berinin®P** 的约13倍(表3)。i.v. 或s.c. 施用rIX-FP或 **Berinin®P** 后未观察到治疗的不良反应。

[0152] 表3: 兔的药代动力学参数估计的几何平均值

[0153]

组	C <sub>max</sub> [IU/mL]	T <sub>max</sub> [h]	T <sub>1/2</sub> [h]	AUC <sub>0-infin.</sub> [h*IU/mL]	AUC 第一-最后>0 [h*IU/mL]	清除率 [mL/h/kg]	F [%]
1 <b>Berinin®P</b> , 500 IU/kg s.c.	0.17	9.52	20	6	5	87.96	N.a.
2 rIX-FP, 500 IU/kg s.c.	1.01	26.42	20	70	70	7.14	43
3 rIX-FP, 150 IU/kg s.c.	0.34	29.07	29	27	26	5.59	55
4 rIX-FP, 150 IU/kg i.v.	1.69	0.44	25	49	48	3.05	N.a.

[0154] 通过非隔室方法估计参数，

[0155] F=生物利用度

[0156] 总之，该研究证明在将rIX-FP皮下施用于兔后生物利用度为43-55%。rIX-FP的s.c. 施用的耐受性良好，具有药理学相关的生物利用度，并且总体暴露优于市售的血浆来源的FIX产品-**Berinin®P**。

- [0157] B.i.v. 相对s.c. 施用至猪后 CSL654 (rIX-FP) 的药代动力学
- [0158] 本研究的目的是研究对猪进行静脉内和皮下施用后 rIX-FP 的药代动力学特征(包括皮下生物利用度)。
- [0159] 两组猪(每组包含3只雄性动物) 接受单次静脉内 (i.v.) 剂量的250IU/kg rIX-FP 或单次皮下 (s.c.) 剂量的241.5IU/kg rIX-FP。此后, 基于使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法测定FIX抗原浓度, 在给药后跟踪凝血因子IX (FIX) 血浆水平17天。
- [0160] 施用至猪的rIX-FP是良好耐受的, 即i.v.或s.c.施用后没有观察到治疗的副作用。
- [0161] 在s.c.施用rIX-FP之后, 在约22小时后达到峰值FIX血浆水平(图2,表4)。s.c. 应用后rIX-FP的各自生物利用度为22%。在s.c. (53h) 和i.v. (44h) 给药后, 终末半衰期是相当的。
- [0162] 表4:猪中药代动力学参数估计的几何平均值
- [0163]

组	T <sub>max</sub> [h]	C <sub>max</sub> [IU/mL]	AUC <sub>0-infin.</sub> [h*mg/mL]	清除率 [mL/h/kg]	T <sub>1/2</sub> [h]	F [%]
1 rIX-FP, 250 IU/kg i.v.	0.08	2.68	124	2.0	44	-
2 rIX-FP, 241.5 IU/kg s.c.	22	0.26	26	9.1	53	22

- [0164] 通过非隔室方法估计参数。
- [0165] 药代动力学研究显示s.c.施用rIX-FP后的生物利用度为22%, 而终末半衰期与静脉内给药相当。
- [0166] C.i.v. 相对s.c. 施用至灵长类动物后 rIX-**FP/BeneFIX**<sup>®</sup> 的药代动力学
- [0167] 设计本研究以评估单次静脉内和皮下给药至雄性和雌性食蟹猴后 rIX-FP 的药代动力学。**BeneFIX**<sup>®</sup> 是一种市售产品并用作参考测试项目。
- [0168] 七组食蟹猴(每组包含一只雄性动物和一只雌性动物) 接受单次静脉内或皮下剂量的rIX-FP或 **BeneFIX**<sup>®</sup>, 剂量水平范围为125 IU/kg至500 IU/kg。在10天的时间内从每只猴子中取血样。由于第1、2和4组中制剂的制备不正确, 仅分析了第3、5、6和7组的血浆样品。
- [0169] 使用经验证的ELISA方法进行猴血浆样品中人因子IX浓度的测定。
- [0170] 施用rIX-FP或 **BeneFIX**<sup>®</sup>后未观察到局部难耐性。
- [0171] 静脉内施用rIX-FP和皮下施用rIX-FP和 **BeneFIX**<sup>®</sup>后的药代动力学浓度数据是可变的, 并且由于样品中检测到的内源因子IX水平和个体动物之间内源因子IX水平的高度可变性很难确定何时实现回到背景水平。因此, 这些数据不适合完整的药代动力学数据分析。为了考虑因子IX的内源性水平, 通过从每个时间点的测量浓度减去给药前的浓度来校

正每只猴的因子IX的血浆浓度。这些基线校正的值用于计算rIX-FP和**BeneFIX®**的C<sub>max</sub>和AUC<sub>t</sub>值,以及rIX-FP的生物利用度。

[0172] 静脉内和皮下施用后rIX-FP和**BeneFIX®**的平均血浆浓度-时间曲线示于图3和4中。由这些数据得到的药代动力学参数列于表5中。

[0173] 表5:食蟹猴中的平均药代动力学参数

[0174]

组	测试物质	给药途径	剂量水平 (IU/kg)	C <sub>max</sub> (mIU/mL)	AUC <sub>t</sub> (mIU.h/mL)	F %
3	BeneFIX®	皮下	500	501	37300	-
5	rIX-FP	静脉内	125	2420	118000	-
6	rIX-FP	皮下	125	317	19700	17.0
7	rIX-FP	皮下	500	534	44600	9.29

[0175] 总之,可以得出结论,研究药物的应用具有良好的耐受性,皮下施用rIX-FP后的C<sub>max</sub>和AUC<sub>t</sub>值高于施用**BeneFIX®**后的各自值,并且在皮下施用rIX-FP后,在125 IU/kg和500 IU/kg的剂量水平下的生物利用度分别为17.0%和9.29% (平均值:13%)。

[0176] D. 皮下施用至血友病B小鼠后rIX-FP的生物利用度

[0177] 此研究的目的是研究皮下施用至血友病B小鼠后rIX-FP的生物利用度,并进一步比较其皮下药代动力学特征与市售的重组人凝血因子IX (FIX) 产品(即**BeneFIX®**)的皮下药代动力学特征。

[0178] 五组血友病B小鼠(每组包含12-15只雌性或雄性动物)接受剂量水平分别为125IU/kg (rIX-FP) 和250IU/kg (rIX-FP和**BeneFIX®**)的单次皮下(s.c.)剂量或剂量为125IU/kg (rIX-FP) 的单次静脉内(i.v.)剂量。此后,抽取血样长达四天。随后使用凝血测定法和酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别进行鼠血浆样品中人FIX活性和抗原浓度的测定。

[0179] 在本研究的一部分中,将rIX-FP的s.c.施用与各自的i.v.给药进行比较。在研究的第二部分,比较了rIX-FP的两个不同s.c.剂量,同时另外将最高剂量与等剂量的**BeneFIX®**进行了比较。

[0180] 在研究期间i.v.或s.c.施用rIX-FP或**BeneFIX®**后未观察到治疗的局部或全身不良作用。

[0181] 该研究的结果显示,在血友病B小鼠中,rIX-FP在皮下注射后被转运至血管系统。

[0182] 研究第1部分:s.c.施用125IU/kg rIX-FP后,在给药后16小时(活性水平)和24小时(抗原水平)之间达到峰值血浆水平(表6和7)。各自生物利用度为FIX活性水平50%和FIX抗原水平31%。

[0183] 观察到的衍生自活性和抗原FIX水平的PK值的差异可能是由于测定灵敏度的差异(FIX活性测定的测定灵敏度与使用ELISA的抗原测量相比更高)。

[0184] 研究第2部分:在s.c.施用125和250IU/kg rIX-FP之后,使用活性或抗原FIX血浆

水平用于估计,药代动力学与剂量成比例(表6和7)。再次在16至24小时之间达到峰值血浆水平。

[0185] 与s.c.应用**BeneFIX®**相比,s.c.施用250IU/kg rIX-FP后人FIX活性血浆水平更高并且较慢地降低(表6)。因此,rIX-FP的最大血浆水平(0.69IU/mL)是**BeneFIX®**(0.10IU/mL)的约7倍。此外,s.c.施用rIX-FP后的AUC(38.6h\*IU/mL)是**BeneFIX®**(4.6h\*IU/mL)的约8倍。基于FIX抗原水平(表7),rIX-FP给药后的最大FIX血浆水平(0.54IU/mL)是**BeneFIX®**给药后(0.11IU/mL)的约5倍,而在s.c.施用rIX-FP后的AUC(26.0h\*IU/mL)是**BeneFIX®**(1.7h\*IU/mL)的约15倍。

[0186] 表6:血友病B小鼠中药代动力学参数(FIX活性)的估计

[0187]

组	C <sub>max</sub> [IU/mL]	T <sub>max</sub> [h]	T <sub>1/2</sub> [h]	AUC 第一-最后>0 [h*IU/mL]	AUC <sub>0-infin.</sub> [h*IU/mL]	清除率 [mL/h/kg]	F [%]
1. rIX-FP, 125 IU/kg i.v.	1.77	0.08	20	34.4	36.0	3.48	N.a.
2. rIX-FP, 125 IU/kg s.c.	0.36	16.0	30	16.0	18.1	6.91	50
3. rIX-FP, 125 IU/kg s.c.	0.38	16.0	N.c.	21.6	N.c.	N.c.	N.a.
4. rIX-FP, 250 IU/kg s.c.	0.69	24.0	N.c.	38.6	N.c.	N.c.	N.a.
5. <b>BeneFIX®</b> , 250 IU/kg s.c.	0.10	32.0	N.c.	4.6	N.c.	N.c.	N.a.

[0188] 通过非隔室方法估计参数

[0189] N.c.=未计算

[0190] 表7:血友病B小鼠中药代动力学参数(人FIX抗原)的估计

[0191]

组	C <sub>max</sub> [IU/mL]	T <sub>max</sub> [h]	T <sub>1/2</sub> [h]	AUC 第一-最后>0 [h*IU/mL]	AUC <sub>0-infin.</sub> [h*IU/mL]	清除率 [mL/h/kg]	F [%]
1. rIX-FP, 125 IU/kg i.v.	1.89	0.08	20	23.1	24.1	5.2	N.a.
2. rIX-FP, 125 IU/kg s.c.	0.18	24.0	28	6.6	7.4	16.9	31
3. rIX-FP, 125 IU/kg s.c.	0.23	16.0	18	11.7	12.4	10.1	N.a.
4. rIX-FP, 250 IU/kg s.c.	0.54	16.0	32	26.0	30.3	8.2	N.a.
5. BeneFIX <sup>®</sup> , 250 IU/kg s.c.	0.11	8.0	10	1.7	2.0	127.1	N.a.

[0192] 通过非隔室方法估计参数

[0193] 总之, s.c. 施用的 rIX-FP 具有良好的耐受性, 具有药理学相关的生物利用度并且药代动力学优于市售的重组 FIX 产品 **BeneFIX<sup>®</sup>**。

[0194] 实施例2-临床研究

[0195] 皮下施用至血友病B患者后rIX-FP的生物利用度和剂量模拟

[0196] 皮下施用rIX-FP的I期药代动力学研究作为非盲、单次递增剂量研究进行, 以评估皮下(s.c.)施用25或50IU/kg rIX-FP后血友病B受试者(分别为群组1和群组2)中rIX-FP的药代动力学和安全性。还评估了每3天给予15次的25IU/kg的重复剂量施用(群组3)。

[0197] 皮下亚组研究中受试者的主要资格标准是受试者为男性、至少18岁、体重在50.0至100.0kg之间, 目前参加研究CSL654\_3003且患有血友病B(FIX活性≤2%), 以及已接受rIX-FP≥100ED。在3个月期间经历过危及生命的出血事件或进行大手术的受试者没有资格进行该研究。

[0198] 将参加亚组研究的受试者依次分配到群组(群组1[单个25IU/kg剂量], 群组2[单个50IU/kg剂量]或群组3[25IU/kg的重复剂量施用])。

[0199] 单剂量分析(25IU/kg和50IU/kg)

[0200] 对于群组1和群组2, 在先前的rIX-FP施用后至少14天施用单剂量的rIX-FP, 并且在给药前、施用后30分钟、24、48、72、120、168、240和336小时收集血液样品用于PK分析。在第15天的336小时时间点收集最后的SC PK样品后, 施用单次IV剂量的50IU/kg rIX-FP, 并在选定的时间点收集血液样品用于PK分析。使用FIX活性计算PK, 其通过中心实验室(CSL

Behring) 中的一步aPTT测定法测量,并且使用Pathromtin SL作为活化剂。

[0201] 作为亚组研究就诊的结束,受试者在2周内(第28天)返回以评估安全性。在第28天的亚组研究就诊的结束后,受试者恢复其在主要研究中的IV rIX-FP预防方案。

[0202] 基于血浆中FIX活性水平的测量评估皮下施用后rIX-FP的药代动力学。图5A和5B显示了在每个人患者中在(25和50IU/kg)皮下剂量的rIX-FP下未经校正的FIX活性相对时间的图。FIX活性水平针对给药前FIX水平的指数下降进行校正,特别是因为基线高于预期的内源水平(由于患者来自先前的静脉内给药研究的事实)。一旦得到校正,将x个负值(总共30个PK样品点中有4个)设定为0.01%阈值以使得能够进行模型拟合。图6A和6B显示了人患者中通过25和50IU/kg皮下剂量的rIX-FP的ID的经校正的FIX活性相对时间的图。这些图显示SC施用前由IV遗留导致的高给药前水平,并且在所有剂量水平下血浆水平增加范围高于给药前水平2至8%,在SC剂量后24-48小时达到峰值。

[0203] 经校正的PK浓度用于分析以下药代动力学参数,包括浓度相对时间的曲线下面积(AUC),以及Phoenix WinNonlin软件中使用非隔室分析(NCA)方法的生物利用度。对于s.c.和IV给药均使用剂量标准化的部分AUC从0-336小时计算生物利用度,并且对于群组1其为高于基线14.12%至102%,对于群组2其为高于基线10.1%至35.5%(参见表8A)。

[0204] 表8A:生物利用度

[0205] 群组1(单个25IU/kg)

[0206]

ID	AUCSC0-336 hr*IU/dL	SC 剂量 25	AUCIV0-336 hr*IU/dL	IV 剂量 25	F%
38	445.83	25	3157.07	25	14.12
39	1305.41	25	3873.82	25	33.70
40	1283.13	25	3697.45	25	34.70
50*	1425.30	25	2790.42	50	102.16

[0207] 平均值-27.4AUCSC0-336:皮下给药0至336小时的经校正的部分曲线下面积(AUC)(CSL654\_3003研究)

[0208] AUCIV0-336:IV给药0至336小时的经校正的部分曲线下面积(AUC)(CSL654\_3001研究)

[0209] \*接受50IU/kg IV剂量,用剂量标准化AUC计算生物利用度

[0210] 群组2(单个50IU/kg)

[0211]

ID	AUCSC0-336 hr*IU/dL	SC 剂量 50	AUCIV0-336 hr*IU/dL	IV 剂量 25	F%
38	682.31	50	3157.07	25	10.80
39	1544.96	50	3873.82	25	19.94
16	1442.93	50	2952.75	25	24.43
17	1325.26	50	1866.07	25	35.51
21	1142.41	50	6726.73	50	16.98

[0212] 平均值-27.4AUCSC0-336:皮下给药0至336小时的经校正的部分曲线下面积 (AUC) (CSL654\_3003研究)

[0213] AUCIV0-336:IV给药0至336小时的经校正的部分曲线下面积 (AUC) (CSL654\_3001研究)

[0214] 药代动力学分析

[0215] 使用Phoenix WinNonlin软件进行建模和模拟。对于数据表示和图的构建,使用Excel和R软件。

[0216] 使用单纯聚集方法 (**naïve** pooled approach) 对每个个体受试者进行隔室药代动力学分析。最初的估计是从NCA获得的。使用隔室模型拟合估计分布体积 (V)、清除率 (CL) 和吸收速率常数 (Ka)。

[0217] 逐步模型选择基于目标函数值 (OFV) 的最小化。通过各种诊断图 (例如观察到的 (DV)、个体预测的 (IPRED) 相对时间) 检查模型适当性和性能。

[0218] 最终模型是一室加性误差模型,其进一步用于模拟。表8B中提供了每个受试者的参数估计值。

[0219] 由于长达336小时的有限的采样窗口,在336小时后增加了4个时间点以估计消除,假设与IV相似的FIX活性水平的指数下降。通过该假设,吸收的实际SC分数可能大于当前模型拟合/模拟中估计的分数。

[0220] 表8B:来自一室加性模型的参数估计

[0221] 群组1(单个25IU/kg)

[0222]

参数	38	39	40	50
清除率 (dL/hr)	2.11	1.08	0.77	0.89
体积 (dL)	56.09	140.06	24.04	2.53
Ka (1/hr)	0.0037	0.0057	0.0025	0.0046

[0223] 群组2(单个50IU/kg)

[0224]

参数	38	39	16	21
清除率 (dL/hr)	3.00	1.76	1.92	1.96
体积 (dL)	45.95	37.71	9.98	97.85
Ka (1/hr)	0.0047	0.0029	0.0032	0.0042

[0225] 重复剂量分析(每3天25IU/kg)

[0226] 对于群组3,在先前的rIX-FP施用后至少14天和在24小时施用25IU/kg rIX-FP剂量,分析血液样品的给药前、施用后30分钟、3、8、24、48和72小时的血浆FIX活性和凝血活化。

[0227] 群组3中的受试者返回研究地点以进行25IU/kg rIX-FP的SC剂量2和3。在SC剂量3之前,分析血液样品的血浆FIX活性。受试者每3天在家中施用SC剂量4至12并返回研究地点进行SC剂量13。在SC剂量13之前,还收集血液样品由用于血浆FIX活性。在研究地点施用每个剂量后,研究者评估局部耐受性(在30分钟时)并记录AE和任何伴随治疗。剂量14也在家中施用。

[0228] 在研究地点给予25IU/kg rIX-FP的SC剂量15,并在给药前、施用后30分钟、3、8、24、48和72小时评估血液样品的血浆FIX活性和凝血测试的活化。对于在研究地点给予的每个剂量进行局部耐受性以及AE和任何伴随疗法的评估。

[0229] 每个患者的每个时间点的FIX活性显示在表9和图7中。

[0230] 表9:群组3中每3天施用25IU/kg的患者中观察到的FIX活性

[0231]

剂量	1	1	1	1	1	1	1	3
给药后的时间	给药前	30 min	3h	8h	24h	48h	72h	给药前
ID-38	2.2	2.1	2.3	4.2	3.4	3.1	2.1	3.4
ID-39	3.6	3	2.4	6.1	5.2	5.4	4.1	3.5
ID-40	11.6	8.8	9.4	11	12	11	8.9	8.3

剂量	13	15	15	15	15	15	15	15
给药后的时间	给药前	给药前	30 min	3h	8h	24h	48h	72h
ID-38	5.7	5.9	6.2	6	6.9	5.6	6.1	4.6
ID-39	7.5	6.2	7.2	6.5	7.2	5.3	11.4	4.9
ID-40	10.8	11.5	14.5	14.6	11.7	11.1	10.8	8.7

[0232] 作为亚组研究就诊的结束,受试者在2周内(第28天)返回以评估安全性。在第28天的亚组研究就诊的结束后,受试者恢复其在主要研究中的IV rIX-FP预防方案。

[0233] 药代动力学分析

[0234] **NONMEM®**程序7.3版用于此分析(ICON Development Solutions, Ellicott City, Maryland, USA) [NONMEM用户指南]。Pirana(版本2.8.1)用作NONMEM接口。使用First-Order Conditional Estimation Method with Interaction(FOCEI)估计PK参数。Perl-speaks-NONMEM(PsN, 版本3.5.3)用于NONMEM执行和VPC。R(版本2.14.1) (<http://r-project.org>) 用于结果的后期处理和绘图。

[0235] 将使用来自研究CSL654\_2001、CSL654\_2004、CSL654\_3001、CSL654\_3002的数据的来自CSL654的FIX活性的先前开发的来自的静脉内施用的rIX-FP(2-室)群体PK模型(Idelvion最终模型)用作本分析的起始点。配置参数以清除率和分布体积的参数表示。先前的建模已经表明使用对数转换数据可能是有利的;因此,探索了对数转换的FIX活性。使用NONMEM内的Advan4Trans4模型库实施rIX-FP施用的静脉内和皮下途径后FIX活性的同时拟合。

[0236] 对于FIX活性PK模型,假设真正的内源性FIX活性水平不大于2%FIX活性,以与FIX活性≤2%的研究纳入标准一致。因此,当受试者在第一剂量的rIX FP之前观察到的FIX活性值大于2%时,认为这反映了除了真正的内源性FIX活性水平之外的先前FIX产物的残余贡献。因此,观察到的FIX活性水平(FTOT)被假定为内源基线水平(FEND)、先前FIX产物的任何残余贡献(FPP)和归因于CSL654施用的FIX水平增加(FEX)的总和,如下面的等式所示:

[0237]  $FTOT = FEX + FEND + FPP$

[0238] 其中:

[0239]  $FPP = BSE * EXP(- (CL/V1) * TIME)$  但如果  $BSE < 2$  则  $FPP = 0$ 。

[0240] BSE=观察到的给药前FIX活性

[0241] 当FPP下降到低于以下值的最低值时,则FPP=0:BSE,筛选FIX活性,或2%。

[0242] 协变量建模:在此分析中,体重被认为是显著的协变量。

[0243] 模型评估:通过各种图表和计算的度量评估模型的拟合优度(GoF):

[0244] • 观察到的相对于群体和个体预测浓度的图;

[0245] • 条件加权残差(CWRES)相对于群体预测浓度和相对于时间的图;

[0246] 最终模型是同时拟合来自3003研究的群组1和群组3的SC数据和来自包括2001、2004、3001、3002和3003的研究的IV数据的2室模型。体重和重量调整剂量是中心体积有关的显著协变量,并且体重是清除率有关的显著协变量。

[0247] 模拟:

[0248] 最终的FIX活性群体PK模型用于模拟青少年/成人群体中以下IV给药场景的FIX活性-时间曲线(FTOT和FEX):

[0249] • 每天25IU/kg的稳态剂量

[0250] • 每2天25IU/kg的稳态剂量

[0251] • 每3天25IU/kg的稳态剂量

[0252] 对于这些模拟,在模拟数据集中使用个体观察到的给药前FIX活性水平和来自包括在群体PK建模中的青少年/成人的个体体重,并假设10分钟的输注持续时间。对于每个模拟场景,执行1000个模拟数据集的重复。

[0253] 模拟和观察到的谷值FIX活性水平总结在表10中。

[0254] 表10:模拟和观察到的谷值FIX活性水平(IU/dL)

方案	模拟的谷值的 FIX 活性 (IU/dL) 中值(95% CI)	观察到的谷值 FIX 活性 (IU/dL) 3003 研究- 第 15 次给药群组 3 (n=3) 之前 中值(min-max)
每天 25 IU/kg	17.09 (7.94 - 34.036)	NA
每 2 天 25 IU/kg	8.24 (3.86 - 16.86)	NA
每 3 天 25 IU/kg	5.32 (2.58 - 11.02)	6.2 (5.9-11.5)

[0256] 图8A-C显示了每天、每两天和每三天的时间间隔的25IU/kg的FIX活性(IU/dL)相对时间的模拟图,而图8D显示了用来自群组3(n=3)的第15个剂量的观察到的重复PK数据覆盖的每3天25IU/kg的FIX活性(IU/dL)相对时间的模拟图。

[0257] 总结：

[0258] 每3天25IU/kg (重复皮下rIX-FP给药) 后观察到的FIX活性数据(中值6.2IU/dL) 证明了这种rIX-FP给药途径能够维持患者FIX活性水平在轻度血友病患者子类别内(例如,>5IU/dL FIX水平)。修订的群体FIX PK模型包括并充分表征了rIX-FP施用的皮下途径。rIX-FP的单次和重复皮下给药后的个体患者FIX PK拟合证明了最终模型的效用。模拟证实观察到的皮下rIX-FP PK数据与预测的PK曲线很好地对齐。

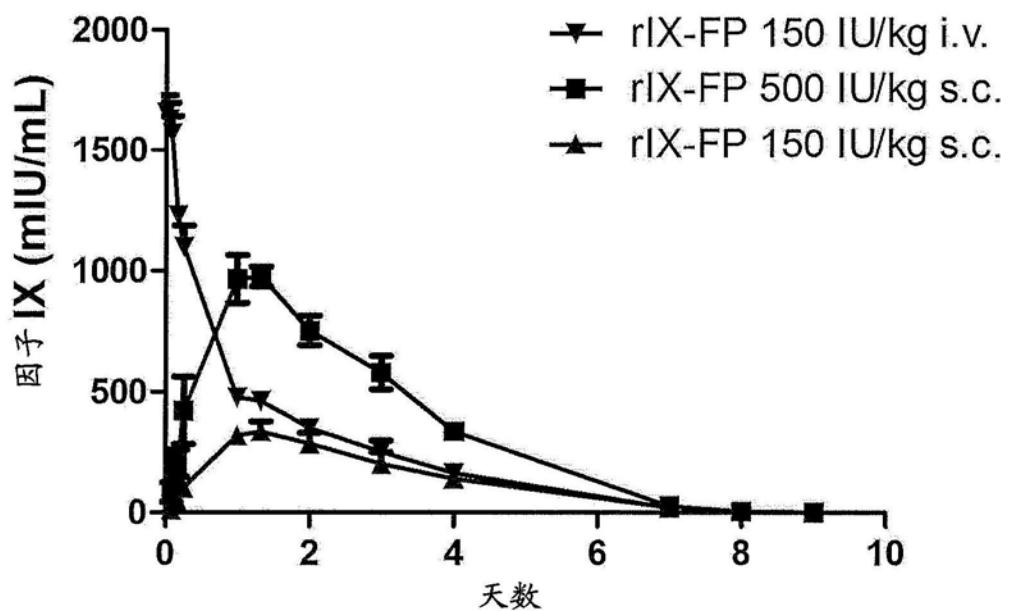


图1

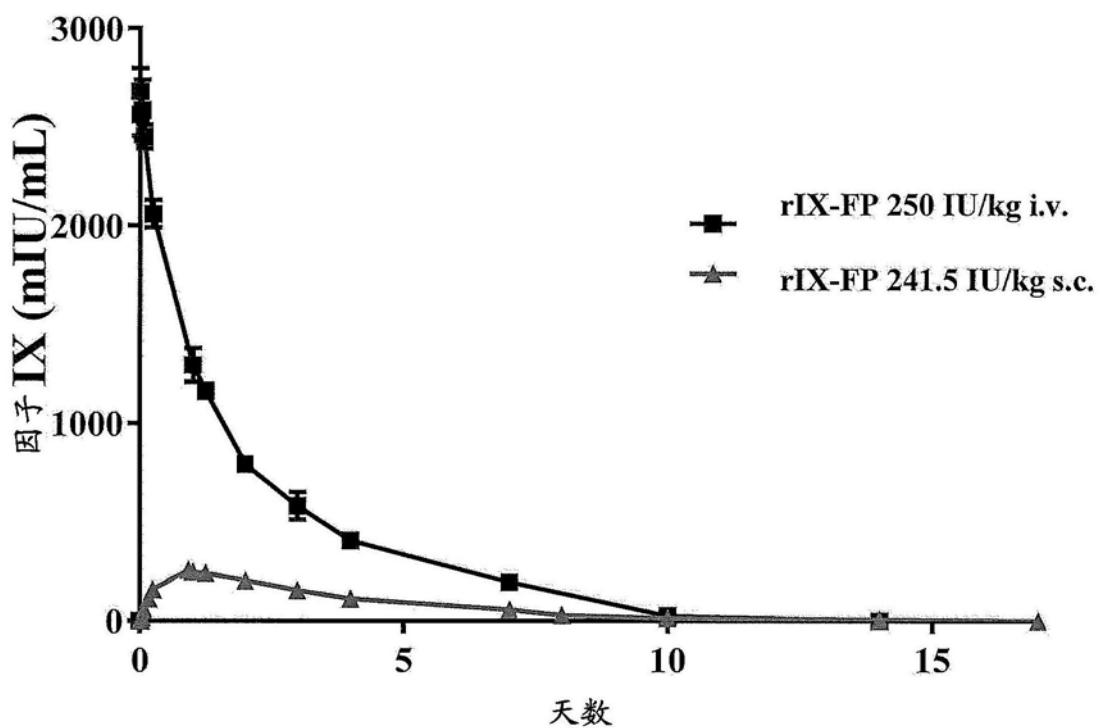


图2

Figure 3

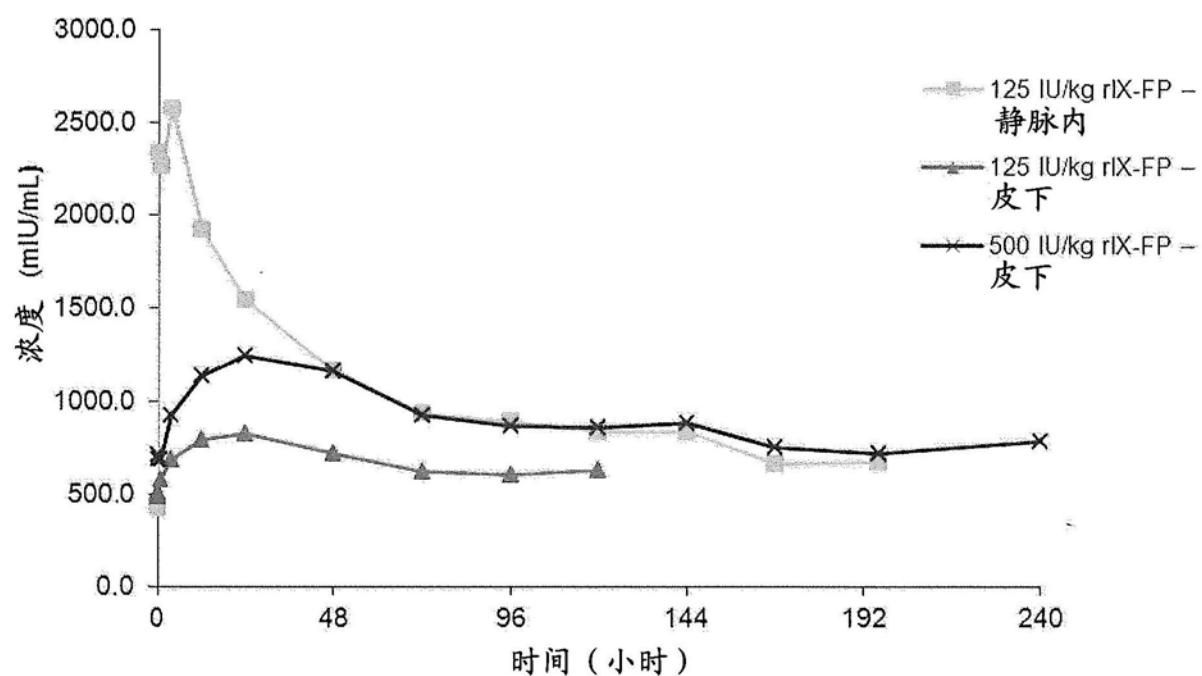


图3

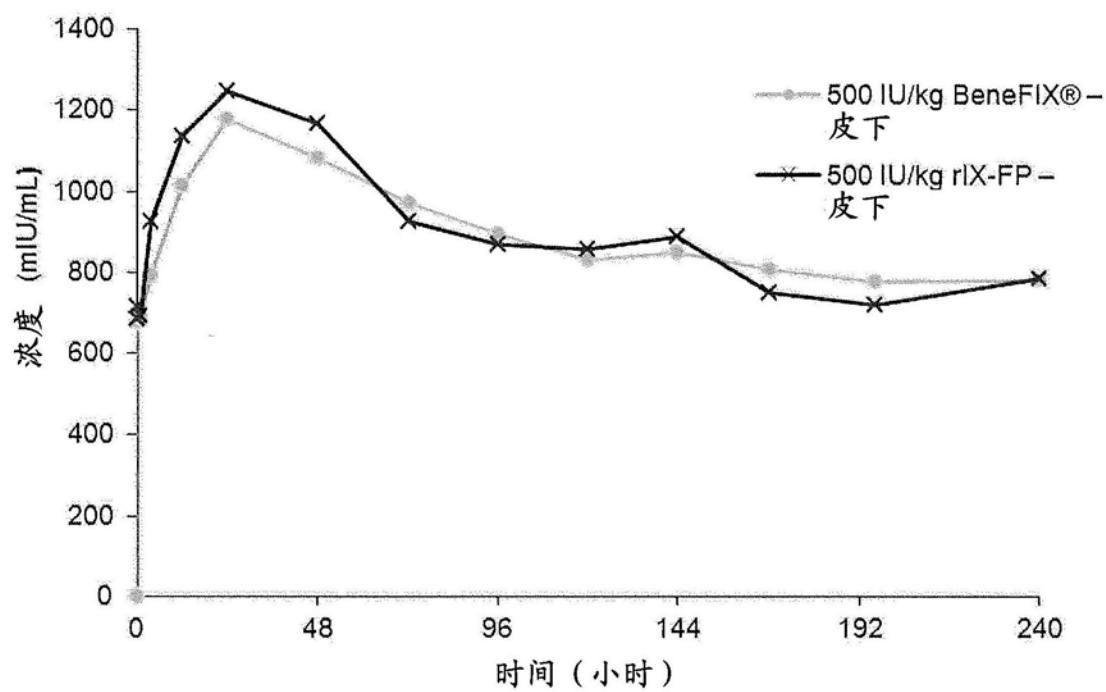


图4

## 群组 1 - 25 IU/kg

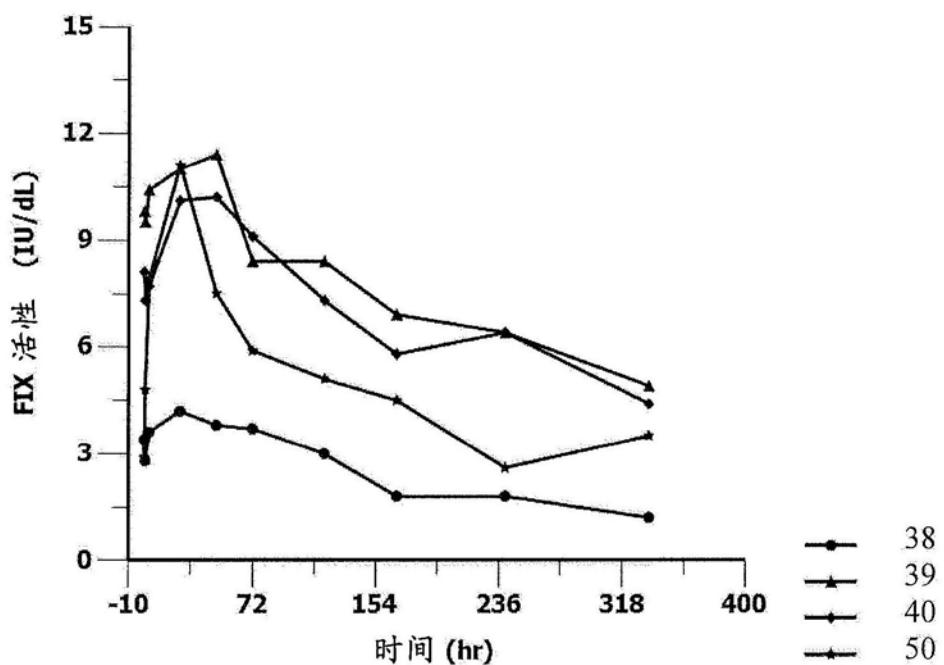


图5A

## 群组 2 - 50 IU/kg

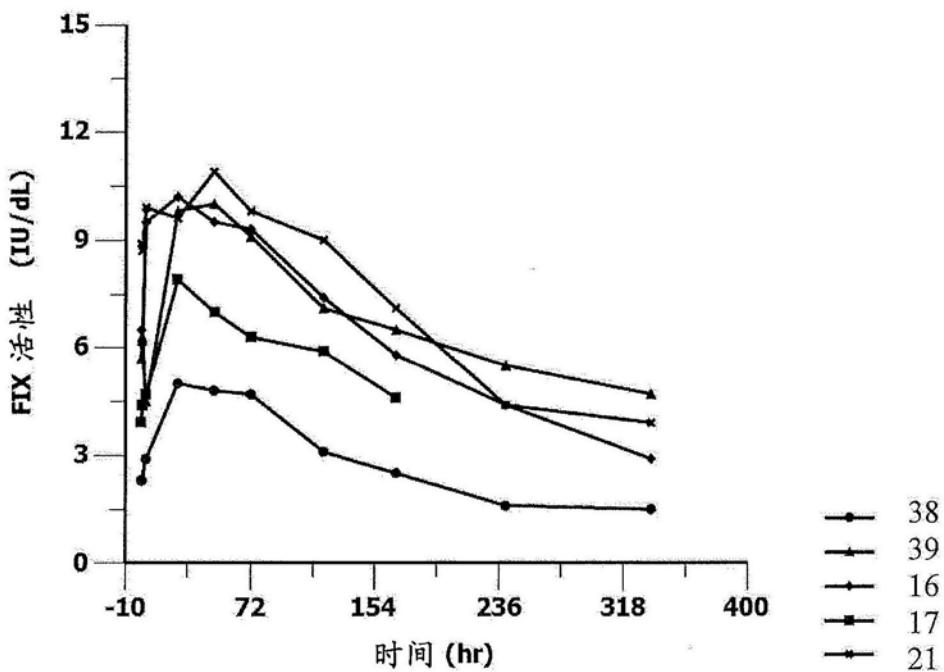


图5B

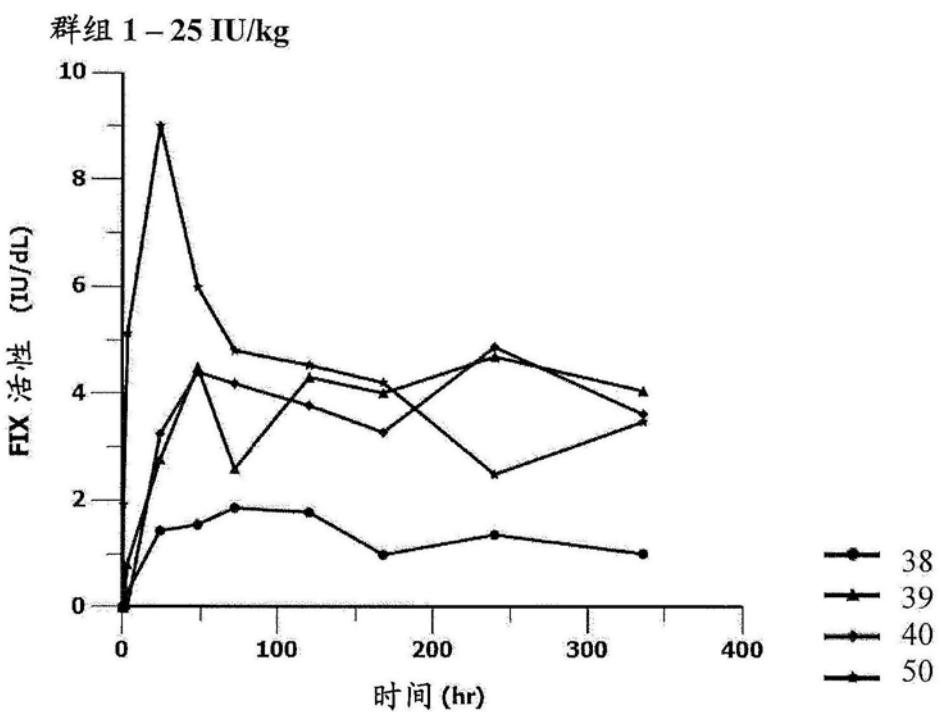


图6A

## 群组 2 – 50 IU/kg

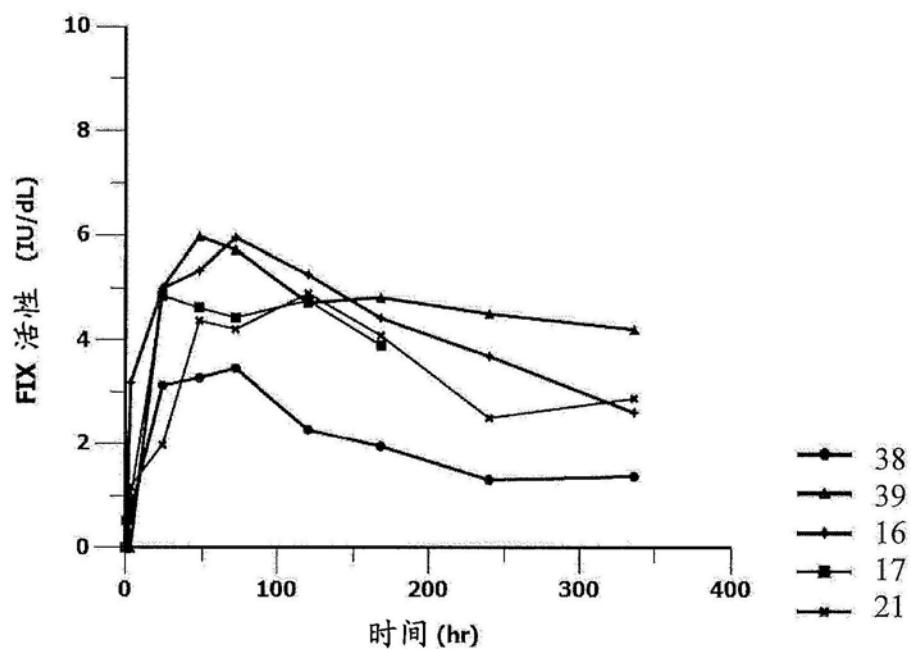


图6B

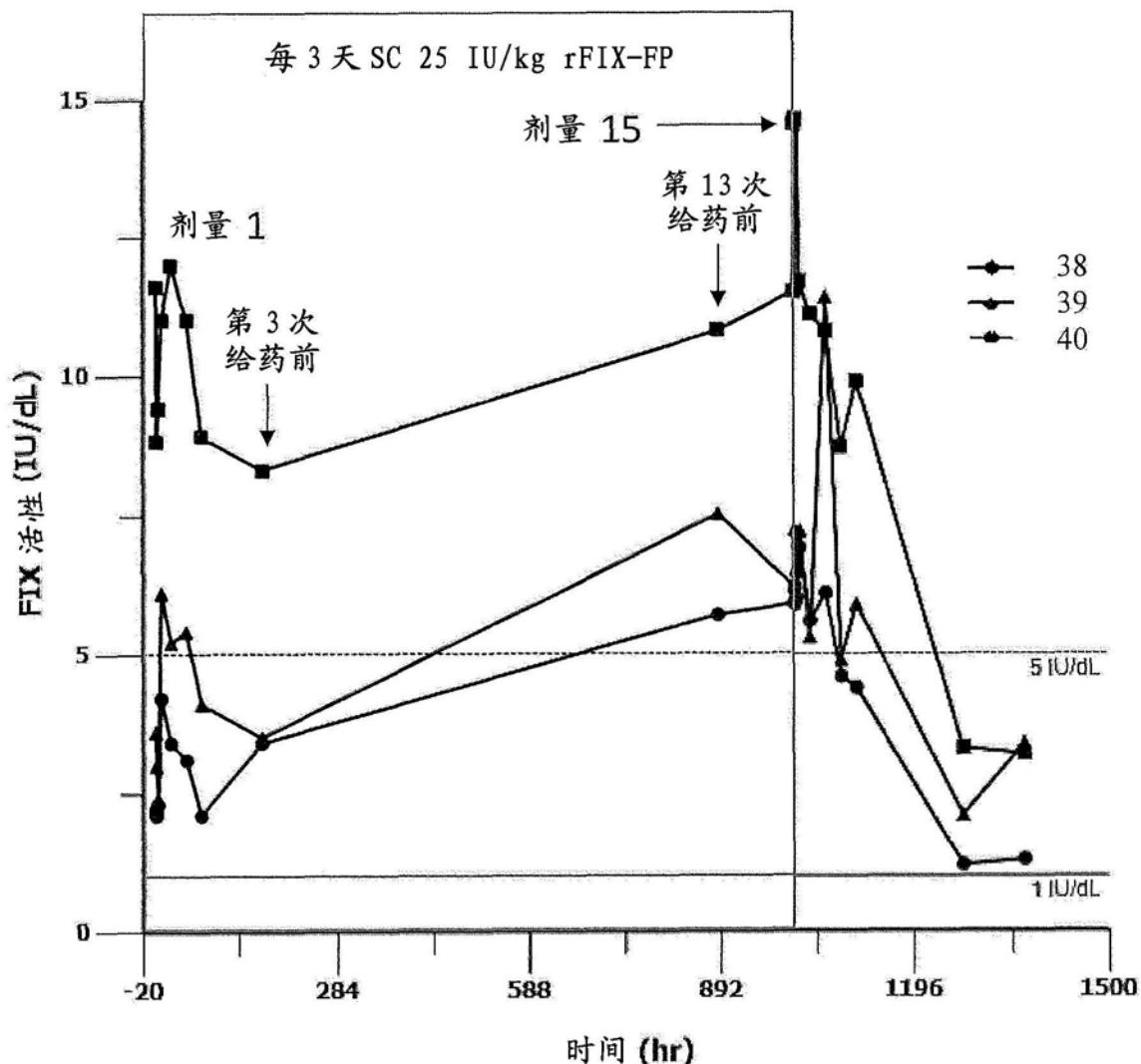


图7

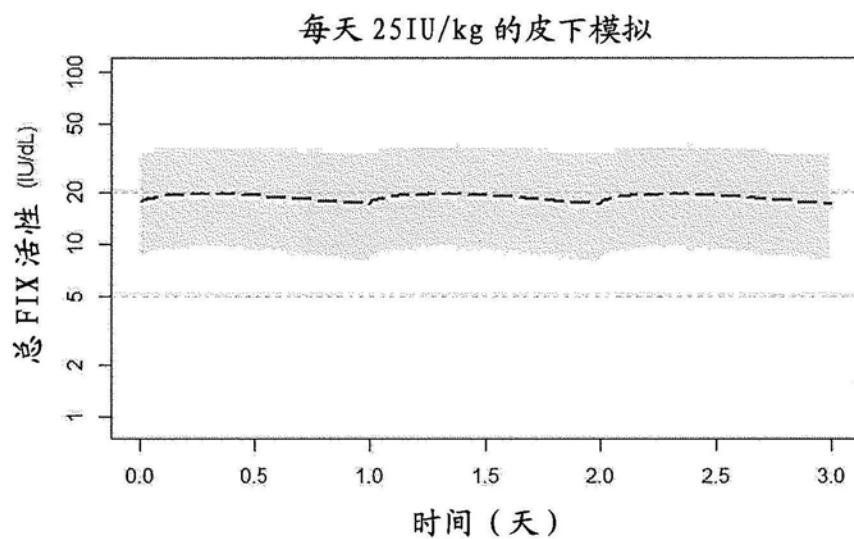


图8A

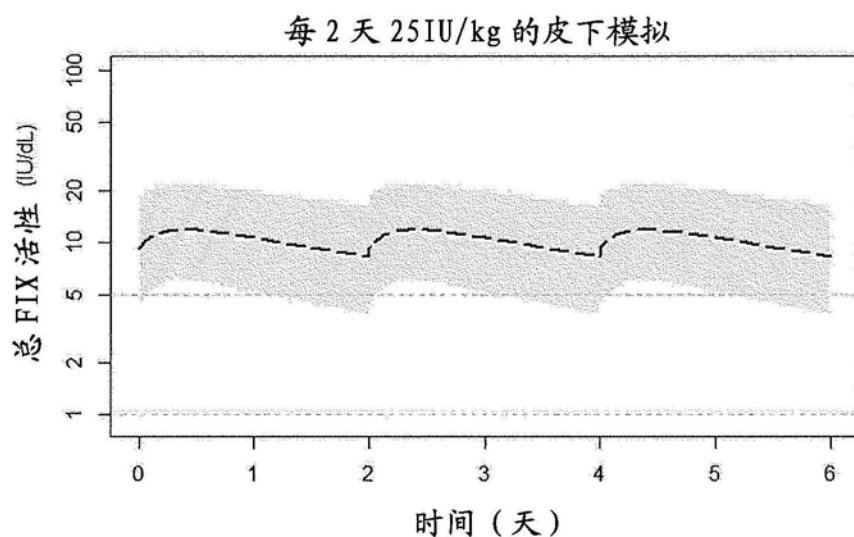


图8B

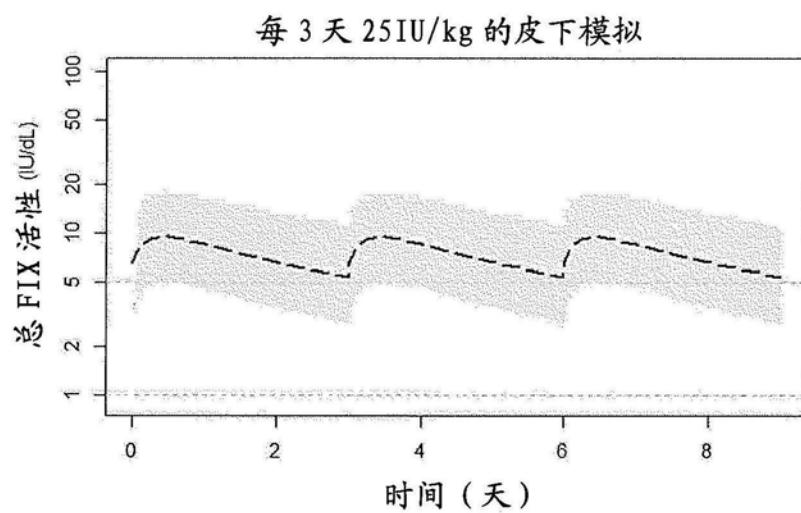


图8C

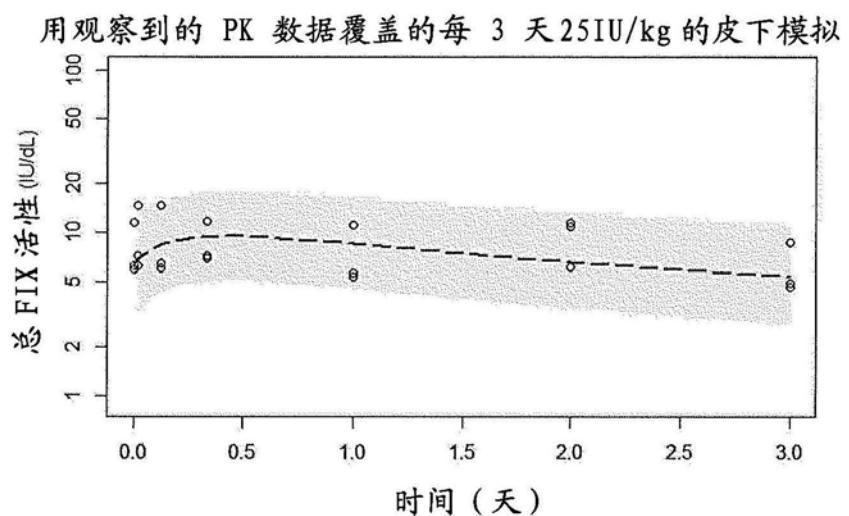


图8D