

(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2013-502218

(P2013-502218A)

(43) 公表日 平成25年1月24日 (2013.1.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A H	4 B 0 2 4
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 255 頁)

(21) 出願番号 特願2012-525649 (P2012-525649)
 (86) (22) 出願日 平成22年8月17日 (2010. 8. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年4月9日 (2012. 4. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/045797
 (87) 国際公開番号 W02011/022427
 (87) 国際公開日 平成23年2月24日 (2011. 2. 24)
 (31) 優先権主張番号 61/366, 362
 (32) 優先日 平成22年7月21日 (2010. 7. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/353, 374
 (32) 優先日 平成22年6月10日 (2010. 6. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/234, 939
 (32) 優先日 平成21年8月18日 (2009. 8. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591013229
 バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
 BAXTER INTERNATIONAL
 L INCORPORATED
 アメリカ合衆国 60015 イリノイ州
 、ディアフィールド、ワン・バクスター・
 パークウェイ (番地なし)

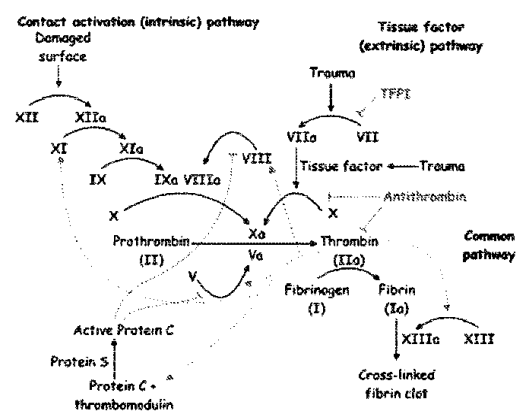
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織因子経路阻害剤に対するアプタマーおよび出血障害治療薬としてのそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、概して、出血障害および／または T F P I が関与すると見なされている他の疾患もしくは障害の治療薬ならびに診断薬として有用である、核酸の分野、より具体的には T F P I に結合するアプタマーに関する。加えて、本 T F P I アプタマーは、医学的手技の前、間、および／または後に使用して、合併症またはその副作用を減少させることができる。本発明はさらに、T F P I に結合するアプタマーの投与のための物質および方法に関する。

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーであって、配列番号 4、1、2、3、5、6、7、8、9、および 10 からなる群から選択される核酸配列を含む、アプタマー。

【請求項 2】

前記 TFPI はヒト TFPI である、請求項 1 に記載のアプタマー。

【請求項 3】

前記アプタマーは、

100 nM 以下のヒト TFPI に対する解離定数を有する、請求項 1 または 2 に記載のアプタマー。

10

【請求項 4】

前記アプタマーは、少なくとも 1 つの化学修飾を含む、請求項 1、2、または 3 に記載のアプタマー。

【請求項 5】

前記修飾は、糖位置での化学的置換、ヌクレオチド間連結での化学的置換、および塩基位置での化学的置換からなる群から選択される、請求項 4 に記載のアプタマー。

【請求項 6】

前記修飾は、修飾ヌクレオチドの組み込み、3' キャッピング、5' キャッピング、高分子量の非免疫原性化合物への共役、脂溶性化合物への共役、CpG モチーフの組み込み、およびリン酸骨格へのホスホロチオエートもしくはホスホロジチオエートの組み込みからなる群から選択される、請求項 4 に記載のアプタマー。

20

【請求項 7】

前記高分子量の非免疫原性化合物は、ポリエチレングリコールである、請求項 6 に記載のアプタマー。

【請求項 8】

前記 3' キャッピングは、逆位のデオキシチミジンのキャッピングである、請求項 6 または 7 に記載のアプタマー。

【請求項 9】

以下に記載の核酸配列：

30

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA（配列番号 1）（ARC 26835）を含み、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'-OMe を含有するヌクレオチドである、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のアプタマーまたはその塩。

【請求項 10】

以下に記載の核酸配列：

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号 2）（ARC 17480）を含み、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'-OMe を含有するヌクレオチドである、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のアプタマーまたはその塩。

40

【請求項 11】

以下に記載の核酸配列：

NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号 3）（ARC 19498）を含み、「NH₂」は 5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトに由来し、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」

50

は 2'-OMe を含有するヌクレオチドである、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のアプタマーまたはその塩。

【請求項 12】

以下に記載の核酸配列：

P E G 4 0 K - N H - m G - m G - m A - m A - m U - m A - m U - m A - d C - m U - m U - m G - m G - d C - m U - d C - m G - m U - m U - m A - m G - m G - m U - m G - d C - m G - m U - m A - m U - m A - m U - m A - 3 T (配列番号 4) (A R C 1 9 4 9 9) を含み、「NH」は 5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトに由来し、「PEG」はポリエチレングリコールであり、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は 2'-OMe を含有するヌクレオチドである、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のアプタマーまたはその塩。

10

【請求項 13】

治療有効量の請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に許容される担体または希釈剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の組成物を対象に投与することを含む、TFPI によって媒介される出血障害を治療する、防止する、その進行を遅延させる、または寛解させるための方法。

【請求項 15】

前記対象は哺乳動物である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記哺乳動物はヒトである、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記出血障害は、血友病 A (第 V I I I 因子欠乏症)、血友病 B (第 I X 因子欠乏症)、および血友病 C (第 X I 因子欠乏症)を含む、先天性または後天性の軽度／中程度／重度の凝固因子欠乏症；阻害因子を有する血友病 A または B；他の因子の欠乏症 (V、V I I、X、X I I I、プロトロンビン、フィブリノーゲン)；α2 プラスミン阻害因子の欠乏；プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 1 の欠乏；多因子の欠乏；機能的因子の異常 (例えば、プロトロンビン異常)；足首、肘、および膝を含むがこれらに限定されない関節出血 (関節血症)；他の部位 (筋肉、胃腸、口等)での特発性出血；出血性卒中；頭蓋内出血；外傷に随伴する裂傷および他の出血；急性外傷性凝固障害；癌 (例えば、急性前骨髄球性白血病)に随伴する凝固障害；フォンビルブランド病；播種性血管内凝固；肝臓疾患；月経過多；ならびに血小板減少のための予防および／またはオンデマンド療法からなる群から選択される、請求項 14～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 18】

前記組成物は、医学的手技の前、間、および／または後に投与される、請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記組成物は、別の薬物との併用で投与される、請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記組成物は、別の療法との併用で投与される、請求項 14～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

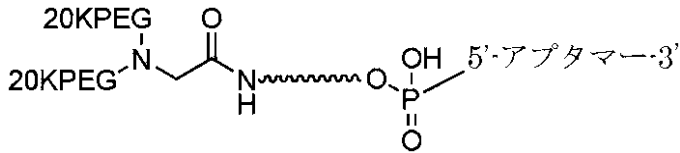
【請求項 21】

請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のアプタマーを含む、キット。

【請求項 22】

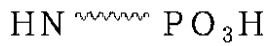
組織因子経路阻害剤 (TFPI) に結合するアプタマーまたはその塩であって、前記アプタマーは、以下の構造：

【化 3 1】



を含み、式中、

【化 3 1 - 2】



10

は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトに由来し、

前記アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号2）の核酸配列を含み、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、20KPEGは、20kDaの分子量を有するmPEG部分である、アプタマーまたはその塩。

【請求項 23】

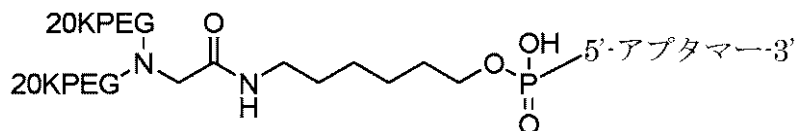
20

前記リンカーは、2～18個の連続するCH₂基、2～12個の連続するCH₂基、4～8個の連続するCH₂基、および6個の連続するCH₂基からなる群から選択される、請求項22に記載のアプタマー。

【請求項 24】

組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーまたはその塩であって、前記アプタマーは、以下の構造：

【化 3 2】



30

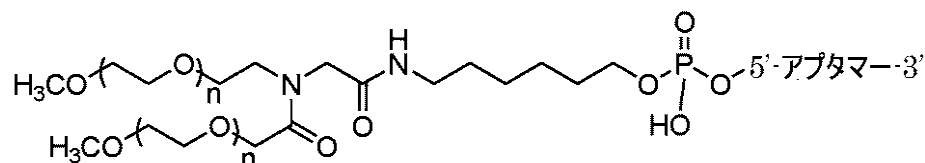
を含み、式中、前記アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号2）の核酸配列を含み、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、20KPEGは、20kDaの分子量を有するmPEG部分である、アプタマーまたはその塩。

【請求項 25】

組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーまたはその塩であって、前記アプタマーは、以下の構造：

40

【化 3 3】



を含み、式中、前記アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-m

50

G-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号2）の核酸配列を含み、「n」は約450であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、アプタマーまたはその塩。

【請求項26】

配列番号15（ARC23085）、配列番号16（ARC23087）、配列番号17（ARC23088）、および配列番号18（ARC23089）からなる群から選択される核酸配列を含む、拮抗薬。

【請求項27】

組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーを生成する方法であって、請求項1～12または22～25のいずれか1項に記載の核酸配列に従う核酸配列を有する核酸を化学的に合成するステップを含む、方法。

10

【請求項28】

前記方法は、前記合成された核酸配列、またはその塩を、薬学的に許容される担体または希釈剤と混合することによって、医薬組成物を製剤化することをさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

拮抗薬を生成する方法であって、請求項26に記載の核酸配列に従う核酸配列を有する核酸を化学的に合成するステップを含む、方法。

【請求項30】

20

前記方法は、前記合成された核酸配列またはその塩を、薬学的に許容される担体または希釈剤と混合することによって、医薬組成物を製剤化することをさらに含む、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

配列番号11のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）ポリペプチドに結合するアプタマーであって、前記アプタマーは、TFPIによって媒介される血液凝固の阻害を調節し、TFPIへの結合において、配列番号4（ARC19499）、配列番号1（ARC26835）、配列番号2（ARC17480）、配列番号3（ARC19498）、配列番号5（ARC19500）、配列番号6（ARC19501）、配列番号7（ARC31301）、配列番号8（ARC18546）、配列番号9（ARC19881）および配列番号10（ARC19882）からなる群から選択される核酸配列を含む参照アプタマーと競合する、アプタマー。

30

【請求項32】

配列番号11のうちの1つ以上の部分を含むヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）ポリペプチド上の領域に結合するアプタマーであって、前記1つ以上の部分は、アミノ酸残基148～170、アミノ酸残基150～170、アミノ酸残基155～175、アミノ酸残基160～180、アミノ酸残基165～185、アミノ酸残基170～190、アミノ酸残基175～195、アミノ酸残基180～200、アミノ酸残基185～205、アミノ酸残基190～210、アミノ酸残基195～215、アミノ酸残基200～220、アミノ酸残基205～225、アミノ酸残基210～230、アミノ酸残基215～235、アミノ酸残基220～240、アミノ酸残基225～245、アミノ酸残基230～250、アミノ酸残基235～255、アミノ酸残基240～260、アミノ酸残基245～265、アミノ酸残基250～270、アミノ酸残基255～275、アミノ酸残基260～276、アミノ酸残基148～175、アミノ酸残基150～175、アミノ酸残基150～180、アミノ酸残基150～185、アミノ酸残基150～190、アミノ酸残基150～195、アミノ酸残基150～200、アミノ酸残基150～205、アミノ酸残基150～210、アミノ酸残基150～215、アミノ酸残基150～220、アミノ酸残基150～225、アミノ酸残基150～230、アミノ酸残基150～235、アミノ酸残基150～240、アミノ酸残基150～245、アミノ酸残基150～250、アミノ酸残基150～255、アミノ酸残基150～260、アミノ酸残

40

50

基150～265、アミノ酸残基150～270、アミノ酸残基150～275、アミノ酸残基150～276、アミノ酸残基190～240、アミノ酸残基190～276、アミノ酸残基240～276、アミノ酸残基242～276、アミノ酸残基161～181、アミノ酸残基162～181、アミノ酸残基182～240、アミノ酸残基182～241、およびアミノ酸残基182～276からなる群から選択される、アプタマー。

【請求項33】

ヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合し、以下の性質：

- a) TFPIへの結合において、配列番号1～10のうちのいずれか1つと競合すること、
 - b) 第Xa因子のTFPI阻害を阻害すること、
 - c) 血友病血漿中のトロンビン生成を増加させること、
 - d) 内因性テナーゼ複合体のTFPI阻害を阻害すること、
 - e) 全血および血漿においてトロンボエラストグラフィー（TEG）で測定される、正常な止血を回復させること、
 - f) より短い凝固時間、より迅速な血栓形成、またはより安定した血栓の発達によって示される、全血および血漿においてトロンボエラストグラフィー（TEG）もしくは回転式トロンボエラストメトリー（ROTEM）で測定される、正常な凝固を回復させること、あるいは
 - g) 希釈プロトロンビン時間（dPT）、組織因子活性凝固時間（TF-ACT）、または任意の他のTFPI感受性凝固時間測定で測定される、前記凝固時間を減少させること、
- のうちの1つ以上を示す、アプタマー。

【請求項34】

ヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーであって、TFPIへの結合において、配列番号4、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10からなる群から選択される参照アプタマーと競合する、アプタマー。

【請求項35】

組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーであって、TFPIへの結合において、直接的または間接的のいずれかで、AD4903からなる群から選択される参照抗体と競合する、アプタマー。

【請求項36】

ヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合し、配列番号4のヌクレオチド配列を有するステムループモチーフを含むアプタマーであって、

- a) ヌクレオチド1、2、3、4、6、8、11、12、13、17、20、21、22、24、28、30、および32のうちの任意の1つ以上が、2'-OMe置換から2'-デオキシ置換に修飾されてもよく、
- b) ヌクレオチド5、7、15、19、23、27、29、および31のうちの任意の1つ以上が、2'-OMeウラシルから2'-デオキシウラシルまたは2'-デオキシチミンのいずれかに修飾してもよく、
- c) ヌクレオチド18が、2'-OMeウラシルから2'-デオキシウラシルに修飾されてもよく、かつ／または
- d) ヌクレオチド14、16、および25のうちの任意の1つ以上が、2'-デオキシシトシンから2'-OMeシトシンまたは2'-フルオロシトシンのいずれかに修飾されてもよい、アプタマー。

【請求項37】

組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーであって、配列番号4、1、2、3、5、6、7、8、9、および10からなる群から選択される一次核酸配列を含む、アプタマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

関連出願の相互参照

本非仮特許出願は、米国特許法第119条(e)35項の下で、2009年8月18日に出願された米国特許仮出願第61/234,939号、2010年6月10日に出願された同第61/353,374号、2010年7月21日に出願された同第61/366,362号、および2010年7月26日に出願された同第61/367,766号に対する優先権の利益を主張するものであり、それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、概して、出血障害および／またはTFPIが関与すると見なされる他の病状、疾患、もしくは障害の治療薬ならびに診断薬として有用である、核酸の分野、より具体的には、組織因子経路阻害剤(TFPI)に結合するアプタマーに関する。本発明はさらに、TFPIに結合するアプタマーの投与のための物質および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

アプタマー

アプタマーは、ワトソンクリック塩基対合以外の相互作用を介して、高い特異性および親和性で標的に結合する、単離または精製された核酸である。アプタマーは、標的に特異的に結合するために化学的接触を提供する三次元構造を有する。従来の核酸結合とは異なり、アプタマー結合は保存直線塩基配列に依存せず、むしろ特定の二次または三次構造に依存している。すなわち、アプタマーの核酸配列は非コード配列である。アプタマーが有し得る任意のコードする可能性は、全く偶発的であり、標的へのアプタマーの結合において、いかなる形であれ何の役割も果たさない。典型的な最小化アプタマーは、5~15 kDaの大きさ(15~45個のヌクレオチド)であり、ナノモルからサブナノモルの親和性で標的に結合し、密接に関連する標的を判別する(例えば、アプタマーは、典型的には、同一の遺伝子または機能的ファミリー由来の他のタンパク質に結合しない)。

【0004】

アプタマーは、成長因子、転写因子、酵素、免疫グロブリン、および受容体を含む、小分子、炭水化物、ペプチド、およびタンパク質等の多数の標的に対して生成されている。

【0005】

アプタマーは、選択された標的に特異的に結合し、例えば、結合を介して、標的の活性または結合相互作用を調節することができ、アプタマーは、標的の機能する能力を阻害もしくは刺激し得る。標的への特異的結合は、アプタマーの先天的性質である。機能的活性、すなわち、標的の機能の阻害または刺激は、アプタマーの先天的性質ではない。多くの場合、アプタマーは標的に結合し、標的の機能にほとんど、あるいは全く影響を及ぼさない。時には、アプタマーが標的に結合し、標的の機能に阻害的または刺激的影響を及ぼすこともある。

【0006】

アプタマーは、高い特異性および親和性、生物学的活性、低い免疫原性、調節可能な薬物動態学的性質、ならびに安定性を含む、治療薬および診断薬としての使用においていくつかの望ましい特性を有する。

【0007】

出血障害

凝固は、出血を止めるのに十分な安定したフィブリン／細胞の止血血栓の形成である。図1に示される凝固プロセスは、3つのステージに分類することができる複雑な生化学的および細胞間相互作用を含む。ステージ1は、接触(内因性)または組織因子／VIIa(外因性)経路のいずれかにより活性化された第X因子の形成である。ステージ2は、第Xa因子によるプロトロンビンからのトロンビンの形成である。ステージ3は、第XIIIa因子で安定化されたフィブリノーゲンからのフィブリンの形成である。

【0008】

血友病は、常にではないが、通常、単一凝固タンパク質の量的および／または機能的欠乏を伴う凝固の先天性または後天性障害と定義される。凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子（血友病A）および第ⅠⅩ因子（血友病B）の欠乏は、2つの最も一般的な遺伝性出血障害である。世界的に見た血友病AおよびB患者の全体的な総数は、約400,000人であるが、これらの個人の約1/4（100,000人）のみが治療を受けている。血友病AおよびBを、因子欠乏の程度に関してさらに分類することができる。軽度の血友病は、正常な因子レベルの5～40%であり、全血友病集団のうちの約25%に相当する。中程度の血友病は、正常な因子レベルの1～5%であり、全血友病集団のうちの約25%に相当する。重度の血友病は、正常な因子レベルの1%未満であり、全血友病集団のうちの約50%に相当し、現在利用可能な療法の利用度が最も高い人々である。

10

【0009】

Poolによる寒冷沈降反応の発見（Pool et al., “High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate”, Nature, vol. 203, p. 312 (1964)（非特許文献1））以来、これらの生命にかかわる欠乏症の治療は、第ⅤⅠⅠⅠ因子および第ⅠⅩ因子濃縮物の質の改善に向けた努力を継続しつつ、因子補充に集中している。最も顕著な改善は、第ⅤⅠⅠⅠ因子および第ⅠⅩ因子の組換え型の有効性である。これらの高度に精製された組換え分子は、それらを血友病の治療に使用される補充因子の基本形態にした安全性および有効性特性を有する。軽度および中程度の患者の大部分は、「要望に応じて」、すなわち、出血が起こったときに治療される。重度の患者の約50～60%が「要望に応じて」治療される一方で、この集団の残りは、毎週2～3回因子を静脈内投与することを含む予防的療法を用いる。

20

【0010】

残念ながら、組換え因子は、依然として、濃縮物およびより高度に精製された血漿由来因子の制限のいくつかを有する。これらの制限には、有効な血漿濃度を維持するために再三にわたる注入が必要となる、分子の比較的短い半減期；高い費用；インヒビター患者と呼ばれる患者の亜集団における、特に第ⅤⅠⅠⅠ因子に対する抗体応答の発達が含まれる。

【0011】

阻害性抗体を発達させる患者の大部分において、この抗体は一過性にすぎない。持続した抗体応答を有する患者（約15%）において、何人かは、複雑で高価な寛容化プロトコルに応答する。寛容化に応答しない患者（約5～10%）は、出血を制御するために非第ⅤⅠⅠⅠ因子／第ⅠⅩ因子製品の使用を必要とする。プロトロンビン複合体濃縮製剤（PCC）、第ⅤⅠⅠⅠ因子インヒビターバイパス製剤（FEIBA）、および組換え第ⅤⅠⅠa因子（NovoSeven（登録商標）、FVIIa）は、インヒビター患者にとって有効な第ⅤⅠⅠⅠ因子／第ⅠⅩ因子バイパス治療である。

30

【0012】

組換え第ⅤⅠⅠa因子（rFVIIa）治療において、これらのバイパス製剤を最もよく使用する。第ⅤⅠⅠa因子は、外因経路を活性化するために内因性組織因子と複合する。これは、第Ⅹ因子を直接的に活性化することもできる。rFVIIa治療への応答は可変である。rFVIIaの弱い薬物動態学的（PK）特性に加えて、可変応答は、出血を制御するために複数回の注入を必要とし、予防的治療に対するその有用性を著しく制限することができる。

40

【0013】

改善された効力、安定性、および循環半減期を有する、修飾された第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、および第ⅤⅠⅠa因子分子の開発に向けた主要な努力が現在進行中である。全ての事例において、製品は、安定性、薬物動態学、および／または既存の補充因子の製剤の漸進的な改善を示すことが留意されるべきである。

【0014】

組織因子／ⅤⅠⅠa（外因性）経路は、第ⅤⅠⅠⅠ因子、第Ⅴ因子、および第ⅠⅩ因子依

50

存性内在経路を開始および迅速化するために最初の止血応答としての機能を果たすことができる低レベルのトロンビンの急速な形成を提供する。組織因子、第V I I a因子、および第X a因子は、この経路において中心的役割を有し、内皮細胞関連クニッツ型プロテナーゼ阻害剤、組織因子経路阻害剤（T F P I）により密接に調節される。

【0015】

組織因子経路阻害剤は、内皮細胞表面で合成され、またそこに結合されると見られ（「表面T F P I」）、2～4 n Mの濃度で血漿中に見られ（「血漿T F P I」）、保存されて（200 p M／10⁸血小板）活性化血小板から放出される、40 k D aセリンプロテアーゼ阻害剤である。血漿T F P Iの約10%が酸化L D L粒子と結合しない一方で、90%は酸化L D L粒子と結合し、不活性である。T F P Iの2種類の基本形態、T F P I α およびT F P I βがある（図2および図3）。

10

【0016】

T F P I αは、3つのK u n i t zデコイドメイン、K 1、K 2、およびK 3を含有する。K 1およびK 2は、プロテアーゼ基質を模倣し、標的プロテアーゼに強力であるが可逆的に結合することによって阻害する。T F P I αに関して、K 1が組織因子／V I I aに結合し、それを阻害する一方で、K 2は、第X a因子に結合し、それを阻害する。K 3の役割は現時点で未知であるが、細胞表面結合における役割およびK 2による第X a因子の阻害を強化する役割を有し得る。T F P I αは、分子の膜結合部位領域である塩基性C末端尾部ペプチドを有する。表面T F P Iの80%がT F P I αであることが推定される。T F P I αは、最初に、膜プロテオグリカンに結合する内皮細胞表面に結合される。ヘパリンは、培養内皮細胞、単離された静脈、その後の静脈内（I V）ヘパリン（未分画およびL M W H）注入からT F P I αを放出することが示されている。放出機序の正確な本質は不明であるが（競合または誘発された放出）、T F P Iレベルは、I Vヘパリン投与後に3～8倍増加し得る。いくつかのT F P I αが未特定の共受容体を介してグリコシル化ホスファチジルイノシトール（G P I）に結合されるとも見なされ得る。

20

【0017】

T F P I βは、グリコシル化ホスファチジルイノシトール（G P I）アンカーと翻訳後に修飾されるT F P Iの選択的にスプライスされた種類である。それは培養内皮細胞中の表面T F P Iの約20%に相当することが推定される。それはインビトロでの阻害活性を有するが、インビボにおける機能的役割はさほど明らかではない。

30

【0018】

表面T F P Iは、血管損傷および血栓形成の部位へのその局在性に基づく凝固の調節においてより重要な役割を有し得る。表面T F P Iは、活性T F P Iの最大比率%に相当する。いくつかの研究所からのデータは、T F P Iが、抗トロンビンI I I（A T I I I）およびタンパク質Cとの相互作用を介して、補完性／相乗効果も有し得ることを示唆する。

【0019】

T F P Iは、そのK 1およびK 2ドメインを介して第V I I a因子および第X a因子に、かつそのK 3およびC末端ドメインを介してプロテオグリカンに結合する。T F P Iが組織因子／V I I aおよびX aの両方の阻害において主要な役割を有するという事実は、T F P I阻害が組換え精製因子に加えて、または組換え精製因子との組み合わせで施される単回治療または補助療法を提供し得ることを示唆する。血栓形成促進状態を促進する取り組みは、組織因子によって媒介される凝固の外因経路の上方調節を介し得る。これは、T F P Iの阻害が血友病患者の凝固を改善する可能性があることを示唆した。

40

【0020】

研究は、マウスにおけるT F P I欠乏が血栓形成を増加させる可能性があり、T F P I抗体が第V I I I因子欠乏ウサギにおいて出血時間を改善し、血友病患者からの血漿凝固時間を短縮することを実証した。ウサギにおいて、一時的な血友病Aは、ウサギを第V I I I因子抗体で処理することにより誘発された。この後に、第V I I I因子補充またはウサギT F P Iに特異的である抗体のいずれかでの処理が続いた。第V I I I因子補充で観察された治療に類似した抗T F P I治療は、出血の減少および凝固の補正をもたらした。L

50

iuら (Liu et al., "Improved coagulation in bleeding disorders by Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides (NASP)", Thromb. Haemost., vol. 95, pp. 68-76 (2006) (非特許文献2)) は、TFPIを阻害する褐藻類から単離された非抗凝固多糖の効果を報告した。Prasadrによる続報 (Prasad et al., "Efficacy and safety of a new-class of hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A", Blood, vol. 111, pp. 672-679 (2008) (非特許文献3)) は、血友病Aイヌにおけるこの多糖も評価した。両研究において、TFPI阻害が、正常な凝固特性の回復、ならびにイヌモデルにおいて、改善されたトロンボエラストグラム (TEG) および爪出血時間の減少を含む止血特性の改善にプラスの影響を与えることが見出された。これらのデータは、TFPIの阻害が血友病を治療する取り組みを提供し得ることを示唆する。

10

したがって、これは、出血障害の治療においてTFPIに拮抗するための新規の治療、または医学的手技と併せて用いられる新規の治療、あるいは凝固前の状態を引き起こすために別の薬物もしくは別の療法との併用で用いられる新規の治療を特定するのに有益であろう。本発明は、これらおよび他の必要性を満たす物質および方法を提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0021】

【非特許文献1】Pool et al., "High-potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate", Nature, vol. 203, p. 312 (1964)

【非特許文献2】Liu et al., "Improved coagulation in bleeding disorders by Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides (NASP)", Thromb. Haemost., vol. 95, pp. 68-76 (2006)

【非特許文献3】Prasad et al., "Efficacy and safety of a new-class of hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A", Blood, vol. 111, pp. 672-679 (2008)

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明は、本明細書で「TFPIアプタマー」と称される組織因子経路阻害剤 (TFPI) に結合するアプタマー、ならびに場合によっては他の作用物質を用いて、出血障害および他のTFPIによって媒介される病状、疾患、または障害の治療においてそのようなアプタマーを用いるための方法を提供する。加えて、合併症またはその副作用を軽減するために、場合によっては他の作用物質を伴って、TFPIアプタマーを、医学的手技の前、間、および／または後に用いることができる。

40

【0023】

TFPIアプタマーは、TFPIまたは1つ以上のその部分（もしくは領域）に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、または

50

それらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。好ましくは、TFPIはヒトTFPIである。好ましくは、TFPIアプタマーはTFPIに結合し、K3/C末端領域等のK1およびK2領域の外側で、少なくともある程度、結合接触を必要とする。より好ましくは、TFPIアプタマーは、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される成熟TFPIの1つ以上の部分（例えば、図3A）に少なくともある程度結合する。好ましくは、TFPIアプタマーは、100nM以下のTFPIに対する解離定数を有する。

【0024】

TFPIアプタマーの例として、本明細書でARC26835と称される配列番号1、本明細書でARC17480と称される配列番号2、本明細書でARC19498と称される配列番号3、本明細書でARC19499と称される配列番号4、本明細書でARC19500と称される配列番号5、本明細書でARC19501と称される配列番号6、本明細書でARC31301と称される配列番号7、本明細書でARC18546と称される配列番号8、本明細書でARC19881と称される配列番号9、および本明細書でARC19882と称される配列番号10からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーが挙げられるが、それらに限定されない。

【0025】

好ましくは、TFPIアプタマーは、以下の核酸配列：mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA（配列番号1）（ARC26835）を含むアプタマーまたはその塩であり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は、（当技術分野において2'-Ome、2'-メトキシ、または2'-OCH₃含有ヌクレオチドとしても既知の）2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、配列番号1の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

【0026】

より好ましくは、TFPIアプタマーは、以下の核酸配列：mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号2）（ARC17480）を含むアプタマーまたはその塩であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、

T F P I アプタマーは、配列番号 2 の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

【0027】

さらにより好ましくは、T F P I アプタマーは、以下の核酸配列：NH₂—mG—mG—mA—mA—mU—mA—mU—mA—dC—mU—mU—mG—mG—dC—mU—dC—mG—mU—mU—mA—mG—mG—mU—mG—dC—mG—mU—mA—mU—mA—mU—mA—3T（配列番号 3）（A R C 1 9 4 9 8）を含むアプタマーまたはその塩であり、「NH₂」は、5'—ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'—Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、T F P I アプタマーは、配列番号 3 の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

10

【0028】

最も好ましくは、T F P I アプタマーは、以下の核酸配列：PEG 40K—NH—mG—mG—mA—mA—mU—mA—mU—mA—dC—mU—mU—mG—mG—dC—mU—dC—mG—mU—mU—mA—mG—mG—mU—mG—dC—mG—mU—mA—mU—mA—mU—mA—3T（配列番号 4）（A R C 1 9 4 9 9）を含むアプタマーまたはその塩であり、「NH」は 5'—ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'—Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「PEG」はポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、T F P I アプタマーは、配列番号 4 の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。いくつかの実施形態において、配列番号 4 の PEG 40K 部分は、40kDa の全分子量を有する分岐 PEG 部分である。他の実施形態において、配列番号 4 の PEG 40K 部分は、40kDa の分子量を有する線状 PEG 部分である。さらなる実施形態において、配列番号 4 の PEG 40K 部分は、40kDa の分子量を有するメトキシポリエチレングリコール（mPEG）部分である。さらにさらなる実施形態において、配列番号 4 の PEG 40K 部分は、図 6～9 に示されるように、それぞれ 20kDa の分子量を有する 2 つの mPEG 20K 部分を含有する分岐 mPEG 部分であり、「20KPEG」は、20kDa の分子量を有する mPEG 部分を指す。好ましい実施形態において、配列番号 4 の PEG 40K 部分は、図 6 に示される分岐 PEG 40K 部分であり、「20KPEG」は、20kDa の分子量を有する mPEG 部分を指し、図 7 に示されるようにアプタマーに結合される。より好ましい実施形態において、PEG 40K 部分は、図 8 に示されるように、5'—アミンリンカーホスホルアミダイトを用いてアプタマーに結合され、「20KPEG」は、20kDa の分子量を有する mPEG 部分を指す。最も好ましい実施形態において、PEG 40K 部分は、40kDa の全分子量を有する mPEG 部分であり、図 9A および 9B に示されるように、5'—ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトを用いてアプタマーに結合される。

20

30

【0029】

あるいは、T F P I アプタマーは、以下の核酸配列：NH₂—mG—mG—mA—mA—mU—mA—mU—mA—dC—mU—mU—mG—mG—dC—mU—dC—mG—mU—mU—mA—mG—mG—mU—mG—dC—mG—mU—mA—mU—mA—mU—mA—NH₂（配列番号 5）（A R C 1 9 5 0 0）を含むアプタマーまたはその塩であり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'—Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「NH₂」はヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来である。いくつかの実施形態において、T F P I アプタマーは、配列番号 5 の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

40

【0030】

段落 [0029] の T F P I アプタマーより好ましい T F P I アプタマーは、以下の核酸配列：PEG 20K—NH—mG—mG—mA—mA—mU—mA—mU—mA—dC—mU—mU—mG—mG—dC—mU—dC—mG—mU—mU—mA—mG—mG—mU—mG—dC—mG—mU—mA—mU—mA—mU—mA—NH—PEG 20K（配

50

列番号6) (ARC19501)を含むアプタマーまたはその塩であり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「NH」はヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「PEG」はポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、配列番号6の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。いくつかの実施形態において、配列番号6のPEG20K部分は分岐PEG部分である。他の実施形態において、配列番号6のPEG20K部分は線状PEG部分である。さらなる実施形態において、配列番号6のPEG20K部分は、20kDaの分子量を有するメトキシポリエチレングリコール(mPEG)部分である。さらにさらなる実施形態において、配列番号6のPEG20K部分は、それぞれ10kDaの分子量を有する2つのmPEG10K部分を含有する分岐mPEG部分である。

10

【0031】

あるいは、TFPIアプタマーは、以下の核酸配列：mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (配列番号7) (ARC31301)を含むアプタマーまたはその塩であり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、配列番号7の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

【0032】

20

段落【0031】のTFPIアプタマーよりも好ましいTFPIアプタマーは、以下の核酸配列：mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (配列番号8) (ARC18546)を含むアプタマーまたはその塩であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、配列番号8の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

【0033】

30

段落【0031】のTFPIアプタマーよりもより好ましいTFPIアプタマーは、以下の核酸配列：NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (配列番号9) (ARC19881)を含むアプタマーまたはその塩であり、「NH₂」は5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、配列番号9の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。

【0034】

40

段落【0031】のTFPIアプタマーよりもさらにより好ましいTFPIアプタマーは、以下の核酸配列：PEG40K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (配列番号10) (ARC19882)を含むアプタマーまたはその塩であり、「NH」は5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「PEG」はポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、配列番号10の核酸配列から成るアプタマーまたはその塩である。いくつかの実施形態において、配列番号10のPEG40K部分は、40kDaの全分子量を有する分岐PEG部分である。他の実施形態において、配列番号

50

10のPEG40K部分は、40kDaの分子量を有する線状PEG部分である。さらなる実施形態において、配列番号10のPEG40K部分は、40kDaの分子量を有するメトキシポリエチレングリコール(mPEG)部分である。さらにさらなる実施形態において、配列番号10のPEG40K部分は、図6～9に示されるように、それぞれ20kDaの分子量を有する2つのmPEG20K部分を含む分岐mPEG部分であり、「20KPEG」は、20kDaの分子量を有するmPEG部分を指す。好ましい実施形態において、配列番号10のPEG40K部分は、図6に示される分岐PEG40K部分であり、「20KPEG」は、20kDaの分子量を有するmPEG部分を指し、図7に示されるようにアダプターに結合される。より好ましい実施形態において、PEG40K部分は、図8に示されるように、5'-アミンリンカーホスホリアミダイトを用いてアダプターに結合され、「20KPEG」は、20kDaの分子量を有するmPEG部分を指す。最も好ましい実施形態において、PEG40K部分は、40kDaの全分子量を有するmPEG部分であり、図9Aおよび9Bに示されるように、5'-ヘキシルアミンリンカーホスホリアミダイトを用いてアダプターに結合される。

10

【0035】

好ましくは、TFPIアダプターは、1つ以上のリンカーの有無にかかわらず、1つ以上のPEG部分に結合される。PEG部分は、任意の型のPEG部分であり得る。例えば、PEG部分は、線形、分岐、多分岐、星形、楕円形、または樹枝状であり得る。加えて、PEG部分は、任意の分子量を有し得る。好ましくは、PEG部分は、5～100kDaの範囲の大きさの分子量を有する。より好ましくは、PEG部分は、10～80kDaの範囲の大きさの分子量を有する。さらにより好ましくは、PEG部分は、20～60kDaの範囲の大きさの分子量を有する。なお一層より好ましくは、PEG部分は、30～50kDaの範囲の大きさの分子量を有する。最も好ましくは、本明細書で「40KPEG」とも称されるPEG部分は、40kDaの大きさの分子量を有する。同一または異なるPEG部分を、TFPIアダプターに結合することができる。同一または異なるリンカーを用いて、同一または異なるPEG部分をTFPIアダプターに結合させてもよく、あるいはリンカーを用いなくてもよい。

20

【0036】

あるいは、TFPIアダプターを、1つ以上のリンカーの有無にかかわらず、(1つ以上のPEG部分に結合するというよりはむしろ)1つ以上のPEG代替物に結合することができる。PEG代替物の例として、ポリオキサゾリン(POZ)、PolyPEG、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、およびアルブミンが挙げられるが、それらに限定されない。PEG代替物は、任意の型のPEG代替物であってもよいが、PEG部分と同一または同様に機能する、すなわち、腎臓濾過を軽減し、循環血液中のTFPIアダプターの半減期を増加させるはずである。同一または異なるPEG代替物を、TFPIアダプターに結合することができる。同一または異なるリンカーを用いて、同一または異なるPEG代替物をTFPIアダプターに結合させてもよく、あるいはリンカーを用いなくてもよい。あるいは、PEG部分およびPEG代替物の組み合わせを、同一または異なるリンカーのうちの1つ以上の有無にかかわらず、TFPIアダプターに結合することができる。

30

【0037】

好ましくは、TFPIアダプターは、1つ以上のリンカーを介してPEG部分またはPEG代替物に結合される。しかしながら、リンカーを使用することなく、TFPIアダプターを、PEG部分またはPEG代替物に直接結合することができる。リンカーは任意の種類の分子であり得る。リンカーの例として、アミン、チオール、およびアジドが挙げられるが、それらに限定されない。リンカーは、リン酸基を含み得る。好ましくは、リンカーは、5'-アミンリンカーホスホリアミダイト由来である。いくつかの実施形態において、5'-アミンリンカーホスホリアミダイトは、2～18個の連続したCH₂基を含む。より好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホリアミダイトは、2～12個の連続したCH₂基を含む。さらにより好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホリアミダイトは、4～8個の連続したCH₂基を含む。最も好ましい実施形態

40

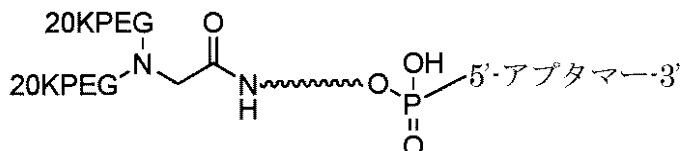
50

において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、すなわち、6個の連続したCH₂基を含む、5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトである。同一もしくは異なるリンカーのうちの1つ以上を用いて、同一もしくは異なるPEG部分のうちの1つ以上または同一もしくは異なるPEG代替物のうちの1つ以上をTFPIアプタマーに結合させてもよく、あるいはリンカーを用いなくてもよい。

【0038】

好ましい実施形態において、以下の構造：

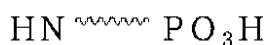
【化1】



10

を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、

【化1-2】



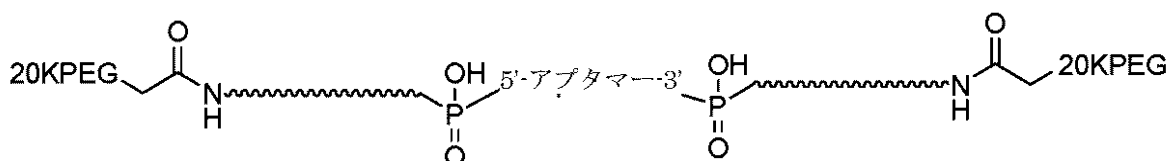
は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。好ましくは、アプタマーは、配列番号2および8からなる群から選択される。20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

20

【0039】

好ましい代替実施形態において、以下の構造：

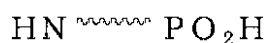
【化2】



30

,
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、

【化2-2】



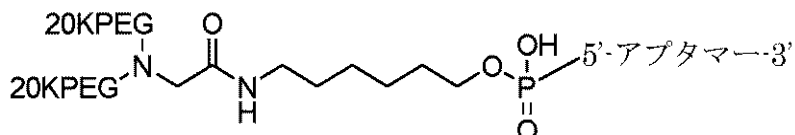
は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。好ましくは、アプタマーは、配列番号1からなる群から選択される。20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

40

【0040】

より好ましい実施形態において、以下の構造：

【化 3】



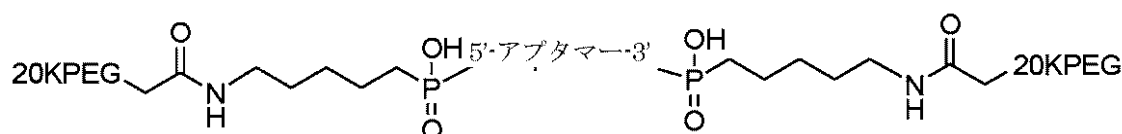
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。好ましくは、アプタマーは、配列番号2および8からなる群から選択される。20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

10

【0041】

より好ましい代替実施形態において、以下の構造：

【化 4】



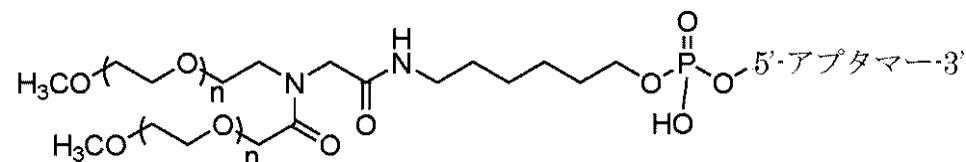
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。好ましくは、アプタマーは、配列番号1からなる群から選択される。20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

20

【0042】

最も好ましい実施形態において、以下の構造：

【化 5】



30

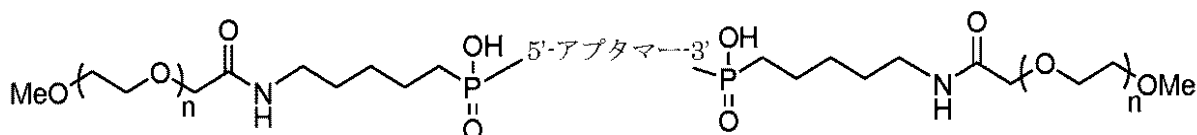
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、「n」は、約454個のエチレンオキシド単位（PEG=20kDa）であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。nの数が特定の分子量を有するPEGに対してわずかに異なり得るため、「n」は、約454個のエチレンオキシド単位である。好ましくは、「n」は、400～500個のエチレンオキシド単位に及ぶ。より好ましくは、「n」は、425～475個のエチレンオキシド単位に及ぶ。さらにより好ましくは、「n」は、440～460個のエチレンオキシド単位に及ぶ。最も好ましくは、「n」は、454個のエチレンオキシド単位である。好ましくは、アプタマーは、配列番号2および8からなる群から選択される。

40

【0043】

最も好ましい代替実施形態において、以下の構造：

【化 6】



を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、「n」は、約454個のエチレンオキシド単位（PEG=20kDa）であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーで

50

ある。n の数が特定の分子量を有する PEG に対してわずかに異なり得るため、「n」は、約 454 個のエチレンオキシド単位である。好ましくは、「n」は、400～500 個のエチレンオキシド単位に及ぶ。より好ましくは、「n」は、425～475 個のエチレンオキシド単位に及ぶ。さらにより好ましくは、「n」は、440～460 個のエチレンオキシド単位に及ぶ。最も好ましくは、「n」は、454 個のエチレンオキシド単位である。好ましくは、アダマーは、配列番号 1 からなる群から選択される。

【0044】

本発明は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の TFPI に結合する能力を有するアダマーも提供する。いくつかの実施形態において、アダマーは、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の構造を有する。いくつかの実施形態において、アダマーは、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の TFPI に結合する能力および実質的に同一の構造を有する。本発明は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の TFPI に結合する能力、および実質的に同一の TFPI の生物学的機能を調節する能力を有するアダマーも提供する。本発明はさらに、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の TFPI に結合する能力および実質的に同一の血液凝固を調節する能力を有するアダマーを提供する。本発明は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の構造および実質的に同一の血液凝固を調節する能力を有するアダマーも提供する。いくつかの実施形態において、アダマーは、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の TFPI に結合する能力、実質的に同一の構造、および実質的に同一の TFPI の生物学的機能を調節する能力を有する。いくつかの実施形態において、アダマーは、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 に示されるアダマーのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の TFPI に結合する能力、実質的に同一の構造、および実質的に同一の血液凝固を調節する能力を有する。

【0045】

TFPI アダマーは、少なくとも 1 つの化学修飾を含み得る。好ましくは、修飾は、糖位置での化学的置換、ヌクレオチド間連結での化学的置換、および塩基位置での化学的置換からなる群から選択される。あるいは、修飾は、修飾ヌクレオチドの組み込み、3' キャッピング、5' キャッピング、高分子量の非免疫原性化合物との共役、脂溶性化合物との共役、CpG モチーフの組み込み、およびリン酸骨格へのホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートの組み込みからなる群から選択される。高分子量の非免疫原性化合物は、好ましくは、ポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、ポリエチレングリコールは、メトキシポリエチレングリコール (mPEG) である。3' キャッピングは、好ましくは、逆位のデオキシチミジンのキャッピングである。

【0046】

本発明は、TFPI に結合し、以下の特性：(i) mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (配列番号 1) の一次ヌクレオチド配列を含むこと、(ii) 配列番号 1 もしくは 7 に示される一次ヌクレオチド配列と、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有する一次ヌクレオチド配列を含むこと、(iii) 配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10 からなる群から選択される一次ヌクレオチド配列を含

10

20

30

40

50

むアプタマーの能力と実質的に同一またはより良好なTFPIに結合する能力を有すること、および／または(i v)配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10からなる群から選択される一次ヌクレオチド配列を含むアプタマーのTFPIを調節もしくは阻害する能力と実質的に同一またはより良好な能力を有することのうちの1つ以上を有するアプタマーも提供する。本明細書で使用される、一次ヌクレオチド配列という用語は、3'～5'修飾にかかわらず、アプタマーを形成する核酸配列のヌクレオチド塩基の5'～3'直線配列を指す。例えば、ARC26835、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC19500、およびARC19501は全て、同一の一次ヌクレオチド配列を有する。

【0047】

本発明はさらに、治療有効量のTFPIアプタマーまたはその塩、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

【0048】

本発明はさらに、対象に上記の医薬組成物を投与することにより、TFPIによって媒介される病状、疾患、または障害を治療するか、予防するか、その進行を遅延させるか、あるいは改善するための方法を提供する。好ましくは、対象は、哺乳動物である。より好ましくは、対象は、ヒトである。好ましくは、病状、疾患、または障害は、血友病A（第V因子欠乏症）、血友病B（第IX因子欠乏症）、および血友病C（第XI因子欠乏症）を含む、軽度もしくは中程度もしくは重度の先天性または後天性凝固因子欠乏症、阻害剤を有する血友病AもしくはB、他の因子の欠乏症（V、VII、X、XII、プロトロンビン、フィブリノーゲン）、α2プラスミン阻害剤の欠乏、プラスミノゲン活性化因子阻害剤1の欠乏、複数の因子欠乏、機能的因子異常（例えば、プロトロンビン異常）、足首、肘、および膝を含むが、それらに限定されない関節出血（関節血症）、他の位置（筋肉、胃腸、口等）における特発性出血、出血性卒中、頭蓋内出血、外傷に関連する裂傷および他の出血、急性外傷性凝固障害、癌（例えば、急性前骨髄球性白血病）に関連する凝固障害、フォンビルブランド病、播種性血管内凝固、肝臓疾患、月経過多、血小板減少、ならびに抗凝固剤の使用に関連する出血（例えば、ビタミンKアンタゴニスト、FXaアンタゴニスト等）からなる群から選択される。

【0049】

医薬組成物を、多数の投与経路で投与することができる。好ましくは、組成物は静脈内投与（IV）される。最も好ましくは、組成物は皮下投与（SCまたはSQ）される。

【0050】

医薬組成物を、様々な治療計画を用いて投与することができる。例えば、本組成物を、患者が出血症状に罹患していない時等に、維持療法として、規定された用量で規定された期間投与することができる。あるいは、本組成物を、患者が出血症状に罹患している時等に、要望に応じて、すなわち、必要に応じて投与することができる。さらなる代替実施形態において、組成物を、維持療法および要望に応じた療法との併用で投与することができる。そのような実施形態において、組成物を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、組成物の投与量を出血が止まるまで必要に応じて増加させ、その時点で、組成物の投与量を以前の維持レベルに減少させて戻す。別のそのような実施形態において、組成物を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、別の出血障害の療法（第VIII因子等）を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、他の出血障害療法が打ち切られる。この全期間中、組成物を維持療法として投与し続ける。さらに別のそのような実施形態において、組成物を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、組成物の投与量を減少させ、別の出血障害療法（第VIII因子等）を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、組成物の投与量を以前の維持レベルまで増加させて戻し、他の出血障害療法が打ち切られる。別のそのような実施形態において、別の出血障害療法（第VIII因子等）を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間を投与することができ、その場合

10

20

30

40

50

、組成物を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、組成物での治療が打ち切られる。この全期間中、他の出血障害療法を維持療法として投与し続ける。さらに別のそのような実施形態において、別の出血障害療法（第ⅤⅠⅠⅠ因子等）を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、他の出血障害療法の投与量を減少させ、組成物を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、他の出血障害療法の投与量を以前の維持レベルに増加させて戻し、組成物での療法が打ち切られる。

【0051】

医薬組成物を、医学的手技の前、間、および／または後に投与することもできる。例えば、医薬組成物を、歯科処置、関節形成術（例えば、人工股関節置換手術）を含むが、それらに限定されない整形外科、外科的または放射性滑膜切除術（RSV）、大手術、静脈穿刺、輸血、および切断術により引き起こされる出血に関連した予防法および／または治療等の医学的手技（前、間、および／もしくは後）と併せて投与することができる。

【0052】

医薬組成物を、活性化プロトロンビン複合体濃縮製剤（APCC）、第ⅤⅠⅠⅠ因子インヒビターバイパス製剤（FEIBA（登録商標））、組換え第ⅤⅠⅠa因子（例えば、NovoSeven（登録商標））、組換え第ⅤⅠⅠⅠ因子（Advate（登録商標）、Kogenate（登録商標）、Recombinate（登録商標）、Helixate（登録商標）、ReFacto（登録商標））、血漿由来第ⅤⅠⅠⅠ因子（Humate P（登録商標）、Hemofil M（登録商標））、組換え第ⅠⅩ因子（BeneFIX（登録商標））、血漿由来第ⅠⅩ因子（Bebulin VH（登録商標）、Konyne（登録商標）、Mononine（登録商標））、寒冷沈降物、酢酸デスマプレシン（DDAVP）、イブシロンアミノカプロン酸、またはトラネキサム酸等の別の薬物との併用で投与することもできる。あるいは、医薬組成物を、血液もしくは血液製剤の輸血、血漿フェレーシス、高用量の補充因子での免疫寛容導入療法、免疫抑制剤（例えば、プレドニゾン、リツキシマブ）での免疫寛容療法、または疼痛治療等の別の療法との併用で投与することができる。

【0053】

TFPIアプタマーを、TFPIタンパク質の特定のために用いることができる。具体的には、TFPIアプタマーを用いて、生物学的試料または他の対象由来試料等の試料中のTFPIタンパク質を特定、定量化、またはさもなければその存在を検出することができる。例えば、TFPIアプタマーを、インビトロアッセイ、例えば、ELISAにおいて用いて、患者試料のTFPIレベルを検出することができる。

【0054】

本発明は、分子がその中でTFPIの1つ以上の部分に結合またはさもなければそれと相互作用する、TFPIを調節するための方法も提供し、少なくとも一部が、K3／C末端領域等のTFPIのK1およびK2ドメインの外側である。分子は、例えば、小分子有機化合物、抗体、タンパク質もしくはペプチド、多糖、核酸、siRNA、アプタマー、または任意のそれらの組み合わせ等の任意の種類の分子であり得る。好ましくは、分子は小分子有機化合物である。より好ましくは、分子は抗体である。最も好ましくは、分子はアプタマーである。例えば、分子は、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。分子が、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、その分子は、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。分子が、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、その分子は、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。好ましくは、分子は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸

10

20

30

40

50

180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される成熟TFPIの1つ以上の部分（例えば、図3A）に少なくともある程度結合する。分子は、好ましくは、100 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形に対する解離定数を含む。

10

20

【0055】

本発明はさらに、出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善のための薬剤の製造におけるTFPIアプタマーの使用を提供する。例えば、ARC26835、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882は、出血障害を治療するか、予防するか、その進行を遅延させるか、またはさもなければ改善するための薬剤の製造において用いられる。

【0056】

一実施形態において、本発明は、出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善の方法で用いるTFPIアプタマーを提供する。

30

【0057】

一実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物の体で実践される診断法で用いる診断組成物または診断薬の製造におけるTFPIアプタマーの使用を提供する。いくつかの実施形態において、診断法は、出血障害の診断を目的とする。

【0058】

一実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物の体で実践される診断法で用いるTFPIアプタマーを提供する。いくつかの実施形態において、診断法は、出血障害の診断を目的とする。

【0059】

一実施形態において、本発明は、インビトロ診断を目的としたTFPIアプタマーの使用を提供する。いくつかの実施形態において、インビトロでの使用は、出血障害の診断を目的とする。

40

【0060】

本発明はさらに、本明細書で「TFPI拮抗薬」と称されるTFPIアプタマーの影響を逆転させる作用物質に関する。TFPI拮抗薬は、タンパク質、抗体、小分子有機化合物、またはオリゴヌクレオチド等の任意の種類分子であり得る。好ましくは、TFPI拮抗薬は、10～15個のヌクレオチド長であるオリゴヌクレオチドである。好ましくは、TFPI拮抗薬は、TFPIアプタマーに結合する。好ましくは、そのような結合は、相補的塩基対合を介する。理論に束縛されることを望むことなく、TFPI拮抗薬は、TFPIアプタマーとハイブリッド形成しながら作用し、それにより、TFPIアプタマーの

50

構造を破壊し、TFPIへのTFPIアプタマーの結合を予防する。

【0061】

TFPI拮抗薬の例として、ARC23085である配列番号15、ARC23087である配列番号16、ARC23088である配列番号17、およびARC23089である配列番号18が含まれるが、それらに限定されない。

【0062】

好ましくは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mA-mG-mC-mC-mA-mA-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mU-mC-mC（配列番号15）を含む核酸であり、式中、「mN」は、（当技術分野において2'-OMe、2'-メトキシ、または2'-OCH₃含有残基としても既知の）2'-Oメチル含有残基である。

10

【0063】

あるいは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mU-mA-mU-mA-mU-mA-mC-mG-mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA（配列番号16）を含む核酸であり、式中、「mN」は、2'-Oメチル含有残基である。

【0064】

あるいは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC（配列番号17）を含む核酸であり、式中、「mN」は、2'-Oメチル含有残基である。

20

【0065】

あるいは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC-mA-mA（配列番号18）を含む核酸であり、式中、「mN」は、2'-Oメチル含有残基である。

【0066】

本発明はさらに、出血障害を治療し、予防し、その進行を遅延させ、および／または改善するための方法を提供し、本方法は、そのような治療を必要とする患者に、TFPI拮抗薬を投与するステップを含む。

【0067】

本発明は、出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善のための薬剤の製造におけるTFPI拮抗薬の使用を提供する。

30

【0068】

したがって、本発明は、患者の出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善のための薬剤の製造におけるTFPI拮抗薬の使用を提供し、本方法は、患者に投与されるTFPIアプタマーの治療効果を制御および／または調節するために、患者にTFPI拮抗薬を投与することを含む。TFPIアプタマーを、TFPI拮抗薬の投与前に、TFPI拮抗薬の投与と同時に、またはTFPI拮抗薬の投与後に投与することができ、併用療法の一環として投与することができる。好ましくは、TFPIアプタマーは、患者の出血障害を治療し、予防し、その進行を遅延させ、および／または改善するために、患者に投与される。

40

【0069】

本発明は、出血障害の治療の制御および／または調節で用いる薬剤の製造におけるTFPI拮抗薬の使用も提供し、出血障害は、TFPIアプタマーで治療される。

【0070】

一実施形態において、本発明は、出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善で用いるTFPI拮抗薬を提供する。

【0071】

したがって、本発明は、患者の出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善で用いるTFPI拮抗薬を提供し、本方法は、患者に投与されるTFPIアプタマー治療効

50

果を制御および／または調節するために、患者に T F P I 拮抗薬を投与することを含む。

【0072】

本発明は、出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善で用いる T F P I 拮抗薬も提供し、出血障害は、T F P I アプタマーで治療される。

【0073】

一実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物の体で実践される診断法で用いる診断用組成物または診断薬の製造における T F P I 拮抗薬の使用を提供する。いくつかの実施形態において、診断法は、出血障害の診断を目的とする。

【0074】

一実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物の体で実践される診断法で用いる T F P I 拮抗薬を提供する。いくつかの実施形態において、診断法は、出血障害の診断を目的とする。

【0075】

一実施形態において、本発明は、インビトロ診断を目的とした T F P I 拮抗薬の使用を提供する。いくつかの実施形態において、インビトロでの使用は、出血障害の診断を目的とする。

【0076】

本発明は、出血障害の治療、予防、進行遅延、および／または改善における1つ以上の T F P I アプタマーの使用法とともに、1つ以上の T F P I アプタマー量を含む少なくとも1つの容器を含むキットも提供する。例えば、キットは、A R C 2 6 8 3 5、A R C 1 7 4 8 0、A R C 1 9 4 9 8、A R C 1 9 4 9 9、A R C 1 9 5 0 0、A R C 1 9 5 0 1、A R C 3 1 3 0 1、A R C 1 8 5 4 6、A R C 1 9 8 8 1、または A R C 1 9 8 8 2、およびそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、アプタマーは、医薬組成物として製剤化される。キットはさらに、拮抗薬の投与に関する指示とともに、T F P I 拮抗薬を含み得る。

【0077】

本発明は、T F P I に結合するアプタマーを生成するための方法も提供し、本方法は、本明細書に記載の T F P I に結合するアプタマーの核酸配列を有する核酸を化学的に合成するステップを含む。本方法はさらに、合成された核酸配列またはその塩を、薬学的に許容される担体または希釈剤と混合することにより、医薬組成物を製剤化するステップを含み得る。

【0078】

本発明はさらに、拮抗薬を生成するための方法を提供し、本方法は、本明細書に記載の T F P I 拮抗薬の核酸配列を有する核酸を化学的に合成するステップを含む。本方法はさらに、合成された核酸配列またはその塩を、薬学的に許容される担体または希釈剤と混合することにより、医薬組成物を製剤化するステップを含み得る。

【0079】

本発明はさらに、S E L E X (商標) プロセスにより特定されたアプタマーを提供し、(a) 結合が起こる条件下で、核酸の混合物を T F P I と接触させるステップ、(b) 未結合核酸を T F P I に結合した核酸から分配するステップ、(c) 結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(d) 所望の回数の周期で、結合、分配、および増幅するステップを繰り返して、T F P I に結合するアプタマーを得るステップを含む。

【0080】

本発明はさらに、T F P I の1つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを特定するための方法を提供し、(a) 結合が起こる条件下で、核酸の混合物を T F P I の1つ以上の部分と接触させるステップ、(b) 未結合核酸を T F P I に結合した核酸から分配するステップ、(c) 結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(d) 所望の回数の周期で、接触、分配、および増幅するステップを繰り返して、T F P I に結合す

10

20

30

40

50

るアプタマーを得るステップを含む。本方法は、全長TFPIに結合し、続いて、分配および増幅する、介在する周期または追加の周期を含み得る。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。好ましくは、成熟TFPIの1つ以上の部分（例えば、図3A）は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

10

20

30

40

50

【0081】

本発明は、TFPIの1つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを特定するための方法も提供し、（a）結合が起こる条件下で、核酸の混合物を全長TFPIもしくはTFPIの1つ以上の部分と接触させるステップ、（b）未結合核酸を全長TFPIもしくはTFPIの1つ以上の部分に結合した核酸から分配するステップ、（c）TFPIの一部を有する結合された核酸、または全長TFPIもしくはTFPIの一部に結合するリガンドを特異的に溶出するステップ、（d）結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、（e）所望の回数の周期で、接触、分配、溶出、および増幅するステップを繰り返して、TFPIの1つ以上の部分に結合するアプタマーを得るステップを含む。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。好

ましくは、成熟TFPIの1つ以上の部分（例えば、図3A）は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

10

20

【0082】

本発明は、TFPIの1つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを特定するための方法も提供し、（a）TFPI上の1つ以上のエピトープがアプタマー結合するのを阻止するTFPIリガンド（TFPIに結合するリガンド）の存在下で結合が起こる条件下で、核酸の混合物を全長TFPIまたはTFPIの1つ以上の部分と接触させるステップ、（b）未結合核酸を全長TFPIまたはTFPIの1つ以上の部分に結合した核酸から分配するステップ、（c）結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、（d）所望の回数の周期で、接触、分配、および増幅するステップを繰り返して、TFPIの1つ以上の部分に結合するアプタマーを得るステップを含む。本方法の他の実施形態において、TFPI上の1つ以上の部分がアプタマー結合するのを阻止するTFPIリガンドの包括は、接触ステップ、分配ステップ、または両方のステップ中に起こり得る。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。好ましくは、成熟TFPIの1つ以上の部分（例えば、図3A）は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265

30

40

50

、アミノ酸 250～270、アミノ酸 255～275、アミノ酸 260～276、アミノ酸 148～175、アミノ酸 150～175、アミノ酸 150～180、アミノ酸 150～185、アミノ酸 150～190、アミノ酸 150～195、アミノ酸 150～200、アミノ酸 150～205、アミノ酸 150～210、アミノ酸 150～215、アミノ酸 150～220、アミノ酸 150～225、アミノ酸 150～230、アミノ酸 150～235、アミノ酸 150～240、アミノ酸 150～245、アミノ酸 150～250、アミノ酸 150～255、アミノ酸 150～260、アミノ酸 150～265、アミノ酸 150～270、アミノ酸 150～275、アミノ酸 150～276、アミノ酸 190～240、アミノ酸 190～276、アミノ酸 240～276、アミノ酸 242～276、アミノ酸 161～181、アミノ酸 162～181、アミノ酸 182～240、アミノ酸 182～241、およびアミノ酸 182～276 からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μ M 未満、1 μ M 未満、500 nM 未満、100 nM 未満、好ましくは 50 nM 以下、好ましくは 25 nM 以下、好ましくは 10 nM 以下、好ましくは 5 nM 以下、より好ましくは 3 nM 以下、さらにより好ましくは 1 nM 以下、および最も好ましくは 500 pM 以下のヒト TFP I またはその変形もしくは 1 つ以上の部分に対する解離定数を含む。

10

【0083】

本発明は、TFP I の 1 つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなくばそれと相互作用するアプタマーを特定するための方法も提供し、(a) 結合が起こる条件下で、核酸の混合物を全長 TFP I もしくは TFP I の 1 つ以上の部分と接触させるステップ、(b) 所望の機能的性質を有する結合された核酸を、所望の機能的性質を有さない結合された核酸から分配するステップ、(c) TFP I の一部を有する結合された核酸、または全長 TFP I もしくは TFP I の一部に結合するリガンドを特異的に溶出するステップ、(d) 所望の機能的性質を有する結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(e) 所望の回数の周期で、接触、分配、分配、および増幅するステップを繰り返して、TFP I の 1 つ以上の部分に結合するアプタマーを得るステップを含む。ステップ (b) およびステップ (c) は、連続して、または同時に起こり得る。好ましくは、所望の機能的性質は、FXa、FVIIa、TFP I 受容体、またはグリコカリックスとの TFP I の相互作用の阻害である。例えば、TFP I アプタマーは、TFP I の直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用し得る。TFP I アプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFP I の直線部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。TFP I アプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFP I の等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。好ましくは、成熟 TFP I の 1 つ以上の部分 (例えば、図 3A) は、アミノ酸 148～170、アミノ酸 150～170、アミノ酸 155～175、アミノ酸 160～180、アミノ酸 165～185、アミノ酸 170～190、アミノ酸 175～195、アミノ酸 180～200、アミノ酸 185～205、アミノ酸 190～210、アミノ酸 195～215、アミノ酸 200～220、アミノ酸 205～225、アミノ酸 210～230、アミノ酸 215～235、アミノ酸 220～240、アミノ酸 225～245、アミノ酸 230～250、アミノ酸 235～255、アミノ酸 240～260、アミノ酸 245～265、アミノ酸 250～270、アミノ酸 255～275、アミノ酸 260～276、アミノ酸 148～175、アミノ酸 150～175、アミノ酸 150～180、アミノ酸 150～185、アミノ酸 150～190、アミノ酸 150～195、アミノ酸 150～200、アミノ酸 150～205、アミノ酸 150～210、アミノ酸 150～215、アミノ酸 150～220、アミノ酸 150～225、アミノ酸 150～230、アミノ酸 150～235、アミノ酸 150～240、アミノ酸 150～245、アミノ酸 150～250、ア

20

30

40

50

ミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

10

【0084】

本発明は、配列番号11のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤(TFPI)ポリペプチドに結合するアプタマーも提供し、アプタマーは、TFPIによって媒介される血液凝固の阻害を調節し、TFPIへの結合において、配列番号4(ARC19499)、配列番号1(ARC26835)、配列番号2(ARC17480)、配列番号3(ARC19498)、配列番号5(ARC19500)、配列番号6(ARC19501)、配列番号7(ARC31301)、配列番号8(ARC18546)、配列番号9(ARC19881)、および配列番号10(ARC19882)からなる群から選択される核酸配列を含む参照アプタマーと競合する。好ましくは、参照アプタマーは、配列番号4の核酸配列(ARC19499)を含む。

20

【0085】

本発明はさらに、配列番号11のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤(TFPI)ポリペプチドに結合するアプタマーを提供し、アプタマーは、アプタマーにより認識される領域の少なくとも一部が、第VIIa因子、第Xa因子、または第VIIa因子および第Xa因子の両方で結合されるTFPI領域と異なるTFPIの直線部分または等角部分に結合する。好ましくは、アプタマーは、アミノ酸残基148～170、アミノ酸残基150～170、アミノ酸残基155～175、アミノ酸残基160～180、アミノ酸残基165～185、アミノ酸残基170～190、アミノ酸残基175～195、アミノ酸残基180～200、アミノ酸残基185～205、アミノ酸残基190～210、アミノ酸残基195～215、アミノ酸残基200～220、アミノ酸残基205～225、アミノ酸残基210～230、アミノ酸残基215～235、アミノ酸残基220～240、アミノ酸残基225～245、アミノ酸残基230～250、アミノ酸残基235～255、アミノ酸残基240～260、アミノ酸残基245～265、アミノ酸残基250～270、アミノ酸残基255～275、アミノ酸残基260～276、アミノ酸残基148～175、アミノ酸残基150～175、アミノ酸残基150～180、アミノ酸残基150～185、アミノ酸残基150～190、アミノ酸残基150～195、アミノ酸残基150～200、アミノ酸残基150～205、アミノ酸残基150～210、アミノ酸残基150～215、アミノ酸残基150～220、アミノ酸残基150～225、アミノ酸残基150～230、アミノ酸残基150～235、アミノ酸残基150～240、アミノ酸残基150～245、アミノ酸残基150～250、アミノ酸残基150～255、アミノ酸残基150～260、アミノ酸残基150～265、アミノ酸残基150～270、アミノ酸残基150～275、アミノ酸残基150～276、アミノ酸残基190～240、アミノ酸残基190～276、アミノ酸残基240～276、アミノ酸残基242～276、アミノ酸残基161～181、アミノ酸残基162～181、アミノ酸残基182～240、アミノ酸残基182～241、およびアミノ酸残基182～276からなる群から選択される配列番号11のアミノ酸配列の少なくとも一部を含む1つ以上の領域に結合する。より好ましくは、アプタマーは、TFPIへの結合において、配列番号4の核酸配列(ARC19499)を含む参照アプタマーと競合する。

30

40

【0086】

本発明は、配列番号4の核酸配列(ARC19499)を含むTFPIアプタマーで結合

50

される領域と同一の、配列番号 11 のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) ポリペプチドの領域に結合するアプタマーも提供する。

【0087】

本発明はさらに、配列番号 11 の 1 つ以上の部分を含むヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) ポリペプチドの領域に結合するアプタマーを提供し、1 つ以上の部分は、アミノ酸残基 148~170、アミノ酸残基 150~170、アミノ酸残基 155~175、アミノ酸残基 160~180、アミノ酸残基 165~185、アミノ酸残基 170~190、アミノ酸残基 175~195、アミノ酸残基 180~200、アミノ酸残基 185~205、アミノ酸残基 190~210、アミノ酸残基 195~215、アミノ酸残基 200~220、アミノ酸残基 205~225、アミノ酸残基 210~230、アミノ酸残基 215~235、アミノ酸残基 220~240、アミノ酸残基 225~245、アミノ酸残基 230~250、アミノ酸残基 235~255、アミノ酸残基 240~260、アミノ酸残基 245~265、アミノ酸残基 250~270、アミノ酸残基 255~275、アミノ酸残基 260~276、アミノ酸残基 148~175、アミノ酸残基 150~175、アミノ酸残基 150~180、アミノ酸残基 150~185、アミノ酸残基 150~190、アミノ酸残基 150~195、アミノ酸残基 150~200、アミノ酸残基 150~205、アミノ酸残基 150~210、アミノ酸残基 150~215、アミノ酸残基 150~220、アミノ酸残基 150~225、アミノ酸残基 150~230、アミノ酸残基 150~235、アミノ酸残基 150~240、アミノ酸残基 150~245、アミノ酸残基 150~250、アミノ酸残基 150~255、アミノ酸残基 150~260、アミノ酸残基 150~265、アミノ酸残基 150~270、アミノ酸残基 150~275、アミノ酸残基 150~276、アミノ酸残基 190~240、アミノ酸残基 190~276、アミノ酸残基 240~276、アミノ酸残基 242~276、アミノ酸残基 161~181、アミノ酸残基 162~181、アミノ酸残基 182~240、アミノ酸残基 182~241、およびアミノ酸残基 182~276 からなる群から選択される。

10

20

【0088】

本発明はさらに、ヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) に結合し、以下の性質：a) TFPI への結合において、配列番号 1~10 のうちのいずれか 1 つと競合すること、b) 第 Xa 因子の TFPI 阻害を阻害すること、c) 血友病血漿中のトロンビン生成を増加させること、d) 内因性テナーゼ複合体の TFPI 阻害を阻害すること、e) 全血および血漿においてトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) で測定される、正常な止血を回復させること、f) より短い凝固時間、より迅速な血栓形成、またはより安定した血栓の発達によって示される、全血および血漿においてトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) もしくは回転式トロンボエラストメトリー (ROTEM) で測定される、正常な凝固を回復させること、g) 希釈プロトロンビン時間 (dPT)、組織因子活性凝固時間 (TF-ACT)、または任意の他の TFPI 感受性凝固時間測定で測定される、凝固時間を減少させることのうちの 1 つ以上を示すアプタマーを提供する。

30

【0089】

本発明は、ヒト組織因子経路阻害剤に結合するアプタマーも提供し、アプタマーは、TFPI への結合において、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 10 からなる群から選択される参照アプタマーと競合する。

40

【0090】

本発明はさらに、組織因子経路阻害剤 (TFPI) に結合するアプタマーを提供し、アプタマーは、TFPI への結合において、直接的または間接的のいずれかで、AD4903 からなる群から選択される参照抗体と競合する。

【0091】

本発明は、ヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) に結合し、配列番号 4 のヌクレオチド配列を有するステムループモチーフを含むアプタマーも提供し、a) ヌクレオチド 1、2、

50

3、4、6、8、11、12、13、17、20、21、22、24、28、30、および32のうちの任意の1つ以上が、2'-OMe置換から2'-デオキシ置換に修飾されてもよく、b)ヌクレオチド5、7、15、19、23、27、29、および31のうちの任意の1つ以上が、2'-OMeウラシルから2'-デオキシウラシルまたは2'-デオキシチミンのいずれかに修飾されてもよく、c)ヌクレオチド18が、2'-OMeウラシルから2'-デオキシウラシルに修飾されてもよく、かつ/またはd)ヌクレオチド14、16、および25のうちの任意の1つ以上が、2'-デオキシシトシンから2'-OMeシトシンまたは2'-フルオロシトシンのいずれかに修飾されてもよい。

【0092】

本発明はさらに、ヒト組織因子経路阻害剤(TFPI)に結合し、配列番号2のヌクレオチド7~28を含むアプタマーを提供する。

10

【0093】

本発明はさらに、上記のアプタマーのうちのいずれか1つを投与することを含む、出血障害を治療するための方法を提供する。

【0094】

本発明はさらに、組織因子経路阻害剤(TFPI)に結合するアプタマーを提供し、アプタマーは、配列番号4、1、2、3、5、6、7、8、9、および10からなる群から選択される一次核酸配列を含む。

【図面の簡単な説明】

【0095】

20

【図1】凝固カスケードの概略図である。

【図2】血管内皮または血漿プールに結合したTFPIの形態説明図である。

【図3A】内皮細胞上で見いだされたTFPIの2つの形態、TFPI α (図3A)、およびTFPI β (図3B)の概略図である。

【図3B】内皮細胞上で見いだされたTFPIの2つの形態、TFPI α (図3A)、およびTFPI β (図3B)の概略図である。

【図4】ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからのインビトロアプタマー選択(SELEX(商標))プロセスの概略図である。

【図5】成熟ヒトTFPIタンパク質のアミノ酸配列の説明図である。

【図6】40kDa分岐PEGの説明図である。

30

【図7】アミンアプタマーの5'末端に結合される40kDa分岐PEGの説明図である。

【図8】5'-アミンリンカーホスホルアミダイトを用いてアプタマーの5'末端に結合される40kDa分岐PEGの説明図である。

【図9A】5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトを用いてアプタマーの5'末端に結合される40kDa分岐PEGの説明図である。

【図9B】5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトを用いてアプタマーの5'末端に結合される40kDa分岐PEGの代替説明図である。

【図10A】2'-Oメチル(円形)および2'-デオキシ(四角形)ヌクレオチドから成り、その5'末端において40kDa PEG部分で、ならびにその3'末端において逆位のデオキシチミジン残基(3T、当技術分野でidTとしても既知である)で修飾される、TFPIアプタマーの説明図である。

40

【図10B】2'-Oメチル(円形)および2'-デオキシ(四角形)ヌクレオチドから成り、その5'末端において40kDa PEG部分およびリンカーで、ならびにその3'末端において逆位のデオキシチミジン残基(3T)で修飾される、TFPIアプタマーの説明図である。

【図10C】2'-Oメチル(円形)および2'-デオキシ(四角形)ヌクレオチドから成り、その5'末端において40kDa分岐PEG部分およびヘキシルアミンホスファート含有リンカーで、ならびにその3'末端において逆位のデオキシチミジン残基(3T)で修飾される、ARC19499の推定構造の説明図である。

50

【図 1 1】標準の単一 P E G 化、複数 P E G 化、P E G 化を介するオリゴマー化等の様々な P E G 化戦略を示す説明図である。

【図 1 2 A】全長 T F P I に密接に結合する A R C 1 7 4 8 0 を示すグラフである。データを、単相モデルおよび二相モデルの両方に当てはめて、結合の K_D を決定する。

【図 1 2 B】t R N A が T F P I に対する A R C 1 7 4 8 0 の親和性を変えることを示すグラフである。アプタマーは、t R N A の存在下で依然として T F P I に密接に結合しており、このことは、T F P I への A R C 1 7 4 8 0 の結合が特異的であることを示唆する。

【図 1 3】放射標識した A R C 1 7 4 8 0、全長 T F P I、および様々な非標識アプタマーでの結合競合実験の結果を示す。非標識 A R C 1 7 4 8 0 および A R C 1 9 4 9 9 (図 1 3 A)、A R C 1 9 4 9 8 (図 1 3 B)、A R C 1 8 5 4 6 (図 1 3 C)、A R C 2 6 8 3 5 および A R C 3 1 3 0 1 (図 1 3 D)、A R C 1 9 5 0 0、A R C 1 9 5 0 1、A R C 1 9 8 8 1、ならびに A R C 1 9 8 8 2 (図 1 3 E) 全てが、結合について放射標識した A R C 1 7 4 8 0 と競合する。

【図 1 4 A】A R C 1 7 4 8 0 ならびに凝固因子、プロテアーゼ阻害剤、および凝固酵素前駆体を含む様々なタンパク質での結合実験を示す一連のグラフである。図 1 4 A は、A R C 1 7 4 8 0 および様々なタンパク質での結合実験のグラフである。

【図 1 4 B】A R C 1 7 4 8 0 および T F P I または様々な活性化凝固因子での結合実験のグラフである。

【図 1 4 C】A R C 1 7 4 8 0 および T F P I または様々なプロテアーゼ阻害剤での結合実験のグラフである。

【図 1 4 D】A R C 1 7 4 8 0 および T F P I または様々な凝固酵素前駆体での結合実験のグラフである。A R C 1 7 4 8 0 は、T F P I への有意な結合を示したが、試験された他のタンパク質のうちのいずれにも有意な結合を示さなかった。

【図 1 5】組換え T F P I への A R C 1 9 4 9 9 の結合を実証するプレートベースのアッセイのデータを示すグラフである。

【図 1 6】A R C 1 9 4 9 9 と競合した、T F P I への A R C 1 9 4 9 8 の結合を実証するプレートベースの競合アッセイのデータを示すグラフである。

【図 1 7 A】放射標識した A R C 1 7 4 8 0、全長 T F P I、および T F P I - H i s での結合アッセイの結果を示す。

【図 1 7 B】放射標識した A R C 1 7 4 8 0、全長 T F P I、切断型 T F P I - K 1 K 2、T F P I - K 3 - C 末端ドメインタンパク質、およびニュートラアビジンの存在下で T F P I の C 末端領域を含有するペプチドでの結合アッセイの結果を示す。

【図 1 8 A】0. 1 m g / m L のヘパリンの不在または存在下における、放射標識した A R C 1 7 4 8 0 および全長 T F P I での結合アッセイの結果を示す。

【図 1 8 B】競合相手として、放射標識した A R C 1 7 4 8 0、1 2. 5 n M の全長 T F P I、ならびに異なる濃度のヘパリンおよび低分子量ヘパリン (L M W H) での結合競合アッセイの結果を示す。

【図 1 9】図 1 9、A および B。プレートベースの結合アッセイにおける、A R C 1 9 4 9 9 との様々な抗 T F P I 抗体の競合を説明する。

【図 2 0】図 2 0、A、B、および C。ニトロセルロース濾過 (ドットプロット) アッセイにおける、A R C 1 9 4 9 9 との様々な抗 T F P I 抗体の競合を説明する。

【図 2 1】外因性 X a s e 阻害アッセイにおける、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。図 2 1 A において、速度 (m O D / 分) を時間 (分) に対してプロットした。T F P I の不在下では、速度は直線であった。1 n M T F P I は、速度を劇的に減少させた。A R C 1 9 4 9 9 の濃度を 0. 0 1 n M から 1 0 0 0 n M に増加させることにより、T F P I なしに近いレベルになるまで、用量依存的様式に速度を増加させた。図 2 1 B において、4 分時点での速度を、T F P I の不在下における 4 分時点での速度に基準化した。A R C 1 9 4 9 9 は、アッセイの速度の用量依存的改善を示し、1 0 n M アプタマーの時点で T F P I なしのレベルに近いレベルに達した。図 2 1 A のデータは、3 つの

10

20

30

40

50

実験の代表であった。図 2 1 B データは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。

【図 2 2】図 2 2、A~C。全長 T F P I および A R C 1 7 4 8 0、A R C 1 8 5 4 6、A R C 2 6 8 3 5、A R C 3 1 3 0 1、A R C 1 9 4 9 8、A R C 1 9 4 9 9、A R C 1 9 5 0 0、A R C 1 9 5 0 1、A R C 1 9 8 8 1、または A R C 1 9 8 8 2 での第 X a 因子 (F X a) 活性アッセイの結果を示す。調整された F X a 基質分解の速度を、アプタマー濃度の関数としてプロットする。速度を、アプタマーの不在下において F X a および T F P I で観察された速度の減算により調整する。アプタマーの全てが T F P I を阻害し、本アッセイにおいて、F X a 活性の濃度依存的増加をもたらす。

【図 2 3】発色性 F X a 活性アッセイにおける、T F P I 阻害からの A R C 1 9 4 9 9 による第 X a 因子 (F X a) 活性の保護を示すグラフである。

【図 2 4】第 X 因子 (F X) 活性化の発色アッセイにおける、T F P I 阻害からの A R C 1 9 4 9 9 による外因性 F X a s e の保護を示すグラフである。

【図 2 5】T F : F V I I a 活性の蛍光アッセイにおける、T F P I 阻害からの A R C 1 9 4 9 9 による T F : F V I I a 複合体の保護を示すグラフである。

【図 2 6】正常な合成凝固プロテオーム (S C P) における組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の影響を示すグラフである。

【図 2 7】血友病 A 合成凝固プロテオームにおける組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の影響を示すグラフである。

【図 2 8】血友病 B 合成凝固プロテオームにおける組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の影響を示すグラフである。

【図 2 9】A R C 1 9 4 9 9 の不在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への第 V I I I 因子 (F V I I I) の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 0】1. 0 n M A R C 1 9 4 9 9 の存在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への第 V I I I 因子 (F V I I I) の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 1】2. 5 n M A R C 1 9 4 9 9 の存在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への第 V I I I 因子 (F V I I I) の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 2】第 V I I I 因子 (F V I I I) の不在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 3】1 0 0 % の第 V I I I 因子 (F V I I I) の存在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 4】2 % の第 V I I I 因子 (F V I I I) の存在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 5】5 % の第 V I I I 因子 (F V I I I) の存在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 6】4 0 % の第 V I I I 因子 (F V I I I) の存在下における、組織因子 (T F) により開始されるトロンビン生成への A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度の影響を示すグラフである。

【図 3 7 A】図 3 7。0. 1 p M 組織因子 (T F、図 3 7 A) または 1. 0 p M T F (図 3 7 B) で開始されるプールされた正常な血漿 (P N P) における自動校正トロンビン生成 (C A T、c a l i b r a t e d a u t o m a t e d t h r o m b o g r a m) アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。内因性トロンビン生成能 (E T P、図 3 7 C) およびピークトロンビン (図 3 7 D) の両方ともに、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的増加を示した。遅延時

10

20

30

40

50

間（図 3 7 E）は、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的減少を示した。

【図 3 7 B】図 3 7。0. 1 p M 組織因子（T F、図 3 7 A）または 1. 0 p M T F（図 3 7 B）で開始されるプールされた正常な血漿（P N P）における自動校正トロンビン生成（C A T、c a l i b r a t e d a u t o m a t e d t h r o m b o g r a m）アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。内因性トロンビン生成能（E T P、図 3 7 C）およびピークトロンビン（図 3 7 D）の両方ともに、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的増加を示した。遅延時間（図 3 7 E）は、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的減少を示した。

10

【図 3 7 C】図 3 7。0. 1 p M 組織因子（T F、図 3 7 A）または 1. 0 p M T F（図 3 7 B）で開始されるプールされた正常な血漿（P N P）における自動校正トロンビン生成（C A T、c a l i b r a t e d a u t o m a t e d t h r o m b o g r a m）アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。内因性トロンビン生成能（E T P、図 3 7 C）およびピークトロンビン（図 3 7 D）の両方ともに、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的増加を示した。遅延時間（図 3 7 E）は、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的減少を示した。

【図 3 7 D】図 3 7。0. 1 p M 組織因子（T F、図 3 7 A）または 1. 0 p M T F（図 3 7 B）で開始されるプールされた正常な血漿（P N P）における自動校正トロンビン生成（C A T、c a l i b r a t e d a u t o m a t e d t h r o m b o g r a m）アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。内因性トロンビン生成能（E T P、図 3 7 C）およびピークトロンビン（図 3 7 D）の両方ともに、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的増加を示した。遅延時間（図 3 7 E）は、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的減少を示した。

20

【図 3 7 E】図 3 7。0. 1 p M 組織因子（T F、図 3 7 A）または 1. 0 p M T F（図 3 7 B）で開始されるプールされた正常な血漿（P N P）における自動校正トロンビン生成（C A T、c a l i b r a t e d a u t o m a t e d t h r o m b o g r a m）アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。内因性トロンビン生成能（E T P、図 3 7 C）およびピークトロンビン（図 3 7 D）の両方ともに、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的増加を示した。遅延時間（図 3 7 E）は、両方の T F 濃度で A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度を伴って用量依存的減少を示した。

30

【図 3 8】0. 0 1、0. 1、または 1. 0 p M 組織因子（T F）で開始される T F P I が枯渇した血漿における自動校正トロンビン生成（C A T）アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。図 3 8 A は、3 つの異なる T F 濃度を有する A R C 1 9 4 9 9 の増加した濃度でのトロンビン生成曲線を示す。内因性トロンビン生成能（E T P、図 3 8 B）、ピークトロンビン（図 3 8 C）、および遅延時間（図 3 8 D）は、全ての試験された T F 濃度での全ての試験された A R C 1 9 4 9 9 濃度において、ほとんど、あるいは全く変化を示さなかった。

40

【図 3 9 A】図 3 9。先に中和した多クローン性抗 T F P I 抗体で処理された、プールされた正常な血漿（P N P）における自動校正トロンビン生成（C A T）アッセイにおいて、A R C 1 9 4 9 9 の活性を示す一連のグラフである。本アッセイを、0. 0 1 p M 組織因子（T F、図 3 9 A）、0. 1 p M T F（図 3 9 B）、または 1. 0 p M T F（図 3 9 C）で開始した。内因性トロンビン生成能（E T P、図 3 9 D）、ピークトロンビン（図 3 9 E）、および遅延時間（図 3 9 F）は、T F 濃度とは無関係である全ての A R C 1 9 4 9 9 濃度において大部分は変化しないままであった。

【図 3 9 B】図 3 9。先に中和した多クローン性抗 T F P I 抗体で処理された、プールされた正常な血漿（P N P）における自動校正トロンビン生成（C A T）アッセイにおいて

50

、ARC19499の活性を示す一連のグラフである。本アッセイを、0.01 pM組織因子(TF、図39A)、0.1 pM TF(図39B)、または1.0 pM TF(図39C)で開始した。内因性トロンビン生成能(ETP、図39D)、ピークトロンビン(図39E)、および遅延時間(図39F)は、TF濃度とは無関係である全てのARC19499濃度において大部分は変化しないままであった。

【図39C】図39。先に中和した多クローン性抗TFPI抗体で処理された、プールされた正常な血漿(PNP)における自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイにおいて、ARC19499の活性を示す一連のグラフである。本アッセイを、0.01 pM組織因子(TF、図39A)、0.1 pM TF(図39B)、または1.0 pM TF(図39C)で開始した。内因性トロンビン生成能(ETP、図39D)、ピークトロンビン(図39E)、および遅延時間(図39F)は、TF濃度とは無関係である全てのARC19499濃度において大部分は変化しないままであった。

10

【図39D】図39。先に中和した多クローン性抗TFPI抗体で処理された、プールされた正常な血漿(PNP)における自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイにおいて、ARC19499の活性を示す一連のグラフである。本アッセイを、0.01 pM組織因子(TF、図39A)、0.1 pM TF(図39B)、または1.0 pM TF(図39C)で開始した。内因性トロンビン生成能(ETP、図39D)、ピークトロンビン(図39E)、および遅延時間(図39F)は、TF濃度とは無関係である全てのARC19499濃度において大部分は変化しないままであった。

20

【図39E】図39。先に中和した多クローン性抗TFPI抗体で処理された、プールされた正常な血漿(PNP)における自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイにおいて、ARC19499の活性を示す一連のグラフである。本アッセイを、0.01 pM組織因子(TF、図39A)、0.1 pM TF(図39B)、または1.0 pM TF(図39C)で開始した。内因性トロンビン生成能(ETP、図39D)、ピークトロンビン(図39E)、および遅延時間(図39F)は、TF濃度とは無関係である全てのARC19499濃度において大部分は変化しないままであった。

30

【図39F】図39。先に中和した多クローン性抗TFPI抗体で処理された、プールされた正常な血漿(PNP)における自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイにおいて、ARC19499の活性を示す一連のグラフである。本アッセイを、0.01 pM組織因子(TF、図39A)、0.1 pM TF(図39B)、または1.0 pM TF(図39C)で開始した。内因性トロンビン生成能(ETP、図39D)、ピークトロンビン(図39E)、および遅延時間(図39F)は、TF濃度とは無関係である全てのARC19499濃度において大部分は変化しないままであった。

40

【図40A】図40。様々な濃度のARC17480(図40A)、ARC19498(図40B)、およびARC19499(図40C)での自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイを示す一連のグラフである。血友病A血漿中のARC17480、ARC19498、およびARC19499の様々な濃度で測定された内因性トロンビン生成能(ETP、図40D)およびピークトロンビン(図40E)は、相互に類似し、ARC19499は、わずかにより大きな活性を有し、30 nMアプタマーの時点で正常な血漿レベルに近いETPプラトーに達した。トロンビン生成曲線(図40A~C)は代表的なデータである。ETP(図40D)およびピークトロンビン(図40E)のデータは、平均±標準誤差、n=3を示す。

50

【図40B】図40。様々な濃度のARC17480(図40A)、ARC19498(図40B)、およびARC19499(図40C)での自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイを示す一連のグラフである。血友病A血漿中のARC17480、ARC19498、およびARC19499の様々な濃度で測定された内因性トロンビン生成能(ETP、図40D)およびピークトロンビン(図40E)は、相互に類似し、ARC19499は、わずかにより大きな活性を有し、30 nMアプタマーの時点で正常な血漿レベルに近いETPプラトーに達した。トロンビン生成曲線(図40A~C)は代表的なデータである。ETP(図40D)およびピークトロンビン(図40E)のデータは、平均±標準誤差、n=3を示す。

準誤差、 $n = 3$ を示す。

【図40C】図40。様々な濃度のARC17480（図40A）、ARC19498（図40B）、およびARC19499（図40C）での自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイを示す一連のグラフである。血友病A血漿中のARC17480、ARC19498、およびARC19499の様々な濃度で測定された内因性トロンビン生成能（ETP、図40D）およびピークトロンビン（図40E）は、相互に類似し、ARC19499は、わずかにより大きな活性を有し、30 nMアプタマーの時点で正常な血漿レベルに近いETPプラトーに達した。トロンビン生成曲線（図40A～C）は代表的なデータである。ETP（図40D）およびピークトロンビン（図40E）のデータは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。

10

【図40D】図40。様々な濃度のARC17480（図40A）、ARC19498（図40B）、およびARC19499（図40C）での自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイを示す一連のグラフである。血友病A血漿中のARC17480、ARC19498、およびARC19499の様々な濃度で測定された内因性トロンビン生成能（ETP、図40D）およびピークトロンビン（図40E）は、相互に類似し、ARC19499は、わずかにより大きな活性を有し、30 nMアプタマーの時点で正常な血漿レベルに近いETPプラトーに達した。トロンビン生成曲線（図40A～C）は代表的なデータである。ETP（図40D）およびピークトロンビン（図40E）のデータは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。

【図40E】図40。様々な濃度のARC17480（図40A）、ARC19498（図40B）、およびARC19499（図40C）での自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイを示す一連のグラフである。血友病A血漿中のARC17480、ARC19498、およびARC19499の様々な濃度で測定された内因性トロンビン生成能（ETP、図40D）およびピークトロンビン（図40E）は、相互に類似し、ARC19499は、わずかにより大きな活性を有し、30 nMアプタマーの時点で正常な血漿レベルに近いETPプラトーに達した。トロンビン生成曲線（図40A～C）は代表的なデータである。ETP（図40D）およびピークトロンビン（図40E）のデータは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。

20

【図41】1人の健常な志願者由来の血小板に乏しい正常な血漿中のトロンビン生成のグラフである。血漿を抗FV111抗体で処理し、血友病A様の状態を生成した。ARC19499は、抗体で処理された血漿中のトロンビン生成の用量依存的増加を示した。

30

【図42】血友病B血漿における様々な濃度のARC19499（図42A）およびARC17480（図42B）での自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイを示す一連のグラフである。

【図43】血友病B血漿における、内因性トロンビン生成能（ETP）、ピークトロンビン、ならびに遅延時間へのARC19499（ひし形）およびARC17480（三角形）の影響を示す一連のグラフである。実線は、任意の薬物の不在下での各パラメータのレベルを示す。斜線は、いかなる追加の薬物も有さない、プールされた正常な血漿（PNP）における各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。両方のアプタマーともに、血友病B血漿において、相互に非常に類似した反応を示した。

40

【図44A】図44。血友病A（図44A）、阻害剤（図44B）を有する血友病A、または血友病B（図44C）を有する患者由来の血漿における自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイで測定された、陰性対照アプタマーと比較したトロンビン生成へのARC19499の影響を示す一連のグラフである。遅延時間（左）、内因性トロンビン生成能（ETP）（中）、およびピークトロンビン濃度（右）に関して得られた結果である。全てのグラフにおいて、線は、アプタマーの不在下での正常な血漿（実線）および因子欠乏血漿（点線）の活性を示し、線周囲の陰影は、平均の標準誤差を示す。

【図44B】図44。血友病A（図44A）、阻害剤（図44B）を有する血友病A、または血友病B（図44C）を有する患者由来の血漿における自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイで測定された、陰性対照アプタマーと比較したトロンビン生成へのARC

50

19499の影響を示す一連のグラフである。遅延時間（左）、内因性トロンビン生成能（ETP）（中）、およびピークトロンビン濃度（右）に関して得られた結果である。全てのグラフにおいて、線は、アプタマーの不在下での正常な血漿（実線）および因子欠乏血漿（点線）の活性を示し、線周囲の陰影は、平均の標準誤差を示す。

【図44C】図44。血友病A（図44A）、阻害剤（図44B）を有する血友病A、または血友病B（図44C）を有する患者由来の血漿における自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイで測定された、陰性対照アプタマーと比較したトロンビン生成へのARC19499の影響を示す一連のグラフである。遅延時間（左）、内因性トロンビン生成能（ETP）（中）、およびピークトロンビン濃度（右）に関して得られた結果である。全てのグラフにおいて、線は、アプタマーの不在下での正常な血漿（実線）および因子欠乏血漿（点線）の活性を示し、線周囲の陰影は、平均の標準誤差を示す。

10

【図45】血友病A血漿中のARC17480、ARC18546、ARC26835、およびARC31301でのトロンビン生成実験の結果を示す。調整された内因性トロンビン生成能（ETP、図45AおよびC）ならびに調整されたピークトロンビン（図45BおよびD）の値を、アプタマー濃度の関数としてプロットする。血友病血漿のETPおよびピークトロンビンの値を各値から減算し、調整値を得た。ARC17480、ARC18546、ARC26835、およびARC31301は、濃度依存的様式で血友病A血漿中のトロンビン生成を増加させる。

【図46】血友病A血漿中のARC17480、ARC19500、ARC19501、ARC19881、およびARC19882でのトロンビン生成実験の結果を示す。調整された内因性トロンビン生成能（ETP、図46A）および調整されたピークトロンビン（図46B）の値を、アプタマー濃度の関数としてプロットする。血友病血漿のETPおよびピークトロンビンの値を各値から減算し、調整値を得た。ARC17480、ARC19500、ARC19501、ARC19881、およびARC19882は、濃度依存的様式で血友病A血漿中のトロンビン生成を増加させる。

20

【図47】正常な血漿における内因性トロンビン生成能（ETP、図47A）、ピークトロンビン（図47B）、ならびに遅延時間（図47C）へのNovoSeven（登録商標）（塗りつぶされていない三角形）およびARC19499（塗りつぶされたひし形）の影響を示すトロンビン生成実験からの一連のグラフである。黒色の実線は、任意の薬物の不在下での各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、n=3を示す。

30

【図48】血友病A血漿における内因性トロンビン生成能（ETP、図48A）、ピークトロンビン（図48B）、ならびに遅延時間（図48C）へのNovoSeven（登録商標）（塗りつぶされていない三角形）およびARC19499（塗りつぶされたひし形）の影響を示すトロンビン生成実験からの一連のグラフである。黒色の実線は、任意の薬物の不在下での各パラメータのレベルを示す。点線は、いかなる追加の薬物も有さない、プールされた正常な血漿（PNP）における各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、n=3を示す。

【図49】血友病Aインヒビター血漿における内因性トロンビン生成能（ETP、図49A）、ピークトロンビン（図49B）、ならびに遅延時間（図49C）へのNovoSeven（登録商標）（塗りつぶされていない三角形）およびARC19499（塗りつぶされたひし形）の影響を示すトロンビン生成実験からの一連のグラフである。黒色の実線は、任意の薬物の不在下での各パラメータのレベルを示す。点線は、いかなる追加の薬物も有さない、プールされた正常な血漿（PNP）における各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、n=3を示す。

40

【図50】健常な志願者由来のクエン酸全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））アッセイにおける、R値（図50A）、角度（図50B）、ならびに最大振幅（MA、図50C）へのNovoSeven（登録商標）（塗りつぶされていない三角形）およびARC19499（塗りつぶされたひし形）の影響を示す実験からの一連のグラフである。黒色の実線は、任意の薬物の不在下での各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、n=3を示す。

50

【図 5 1】抗 F V I I I 抗体で処理された健常な志願者由来のクエン酸全血のトロンボエラストグラフィー（T E G（登録商標））アッセイにおける、R 値（図 5 1 A）、角度（図 5 1 B）、ならびに最大振幅（M A、図 5 1 C）への N o v o S e v e n（登録商標）（塗りつぶされていない三角形）および A R C 1 9 4 9 9（塗りつぶされたひし形）の影響を示す実験からの一連のグラフである。黒色の実線は、任意の薬物の不在下での各パラメータのレベルを示す。点線は、抗体で処理されていない全血における各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。

【図 5 2】遅延時間（図 5 2 A）、ピークトロンビン（図 5 2 B）、および内因性トロンビン生成能（E T P、図 5 2 C）を示すトロンボエラストグラフィー実験からの一連のグラフである。それぞれの線は、異なる割合の第 V I I I 因子の存在下における A R C 1 9 4 9 9 の用量応答を示す（塗りつぶされたひし形 0 %、塗りつぶされていない三角形 1 . 4 %、塗りつぶされた四角形 2 . 5 %、塗りつぶされた三角形 5 %、塗りつぶされていない四角形 1 4 %、および塗りつぶされた円形 1 4 0 %）。点線は、プールされた正常な血漿（P N P）のみの存在下における各パラメータのレベルを示す。実線は、いかなる追加物も有さない、血友病 A 血漿における各パラメータのレベルを示す。データは、平均±標準誤差、 $n = 3$ を示す。

【図 5 3】様々な濃度の第 V I I I 因子（F V I I I）を有する血漿中の A R C 1 9 4 9 9 活性を実証するトロンビン生成実験からの一連のグラフである。図 5 3 A において、内因性トロンビン生成能（E T P）を、A R C 1 9 4 9 9 濃度の関数としてプロットする。点線は、血友病 A 血漿への異なる量の F V I I I の添加後の E T P を示す。実線は、A R C 1 9 4 9 9 が血友病 A 血漿（三角形を有する線）および 5 % の F V I I I を添加した血友病 A 血漿（ひし形を有する線）中の E T P を増加させることを示す。図 5 3 B において、F V I I I 濃度に対する E T P をプロットする。3 0 0 n M A R C 1 9 4 9 9 を添加した E T P データおよび添加しない E T P データが示される。

【図 5 4 A】空間的凝固モデルの実験的設計を説明する。図 5 4 A は、空間的凝固チャンバの略図である。

【図 5 4 B】チャンバ内の血餅進行を測定するためのシステムの構成要素の略図である。

【図 5 5】活性化表面からの距離の関数としてプロットした、光散乱で測定される空間的凝固モデルにおける血餅増殖を説明する 2 つのグラフを示す。凝固を、3 0 0 n M A R C 1 9 4 9 9 の不在（図 5 5 A）および存在（図 5 5 B）下で、正常なプールされた血漿中の低密度の組織因子で活性化した。

【図 5 6】正常なプールされた血漿中の 3 0 0 n M A R C 1 9 4 9 9 の不在（黒色の太線）および存在（灰色の細線）下における時間に対する血餅の大きさのグラフである。このグラフから得ることができるパラメータには、遅延時間（血餅成長の開始までの時間）、初期速度（ α または $V_{\text{初期}}$ 、成長開始後最初の 1 0 分間の平均勾配）、定常速度（ β または $V_{\text{定常}}$ 、成長開始後翌 3 0 分間の平均勾配）、および 6 0 分後の血餅の大きさ（血栓形成効率の積分パラメータ）が含まれる。

【図 5 7】正常なプールされた血漿における遅延時間（図 5 7 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 5 7 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 5 7 C）、および 6 0 分後の血餅の大きさ（図 5 7 D）を示す一連のグラフであり、それぞれ、A R C 1 9 4 9 9 の存在（円形）および不在（四角形）下における組織因子密度の関数としてプロットした。

【図 5 8】正常なプールされた血漿における遅延時間（図 5 8 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 5 8 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 5 8 C）、および 6 0 分後の血餅の大きさ（図 5 8 D）を示す一連のグラフであり、それぞれ、低い表面組織因子密度の条件下で、A R C 1 9 4 9 9 濃度の関数としてプロットした。

【図 5 9】低い表面組織因子密度の条件下で、正常なプールされた血漿における遅延時間（図 5 9 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 5 9 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 5 9 C）、および 6 0 分後の血餅の大きさ（図 5 9 D）への A R C 1 9 4 9 9 の影響を説明する一連のグラフである。星印は、統計的に有意な差異 $\pm$ A R C 1 9 4 9 9（ $P 0 . 0 5$ 未満）を示す。

【図 6 0】正常なプールされた血漿における遅延時間（図 6 0 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 6 0 B）

10

20

30

40

50

、 $V_{定常}$ (図60C)、および60分後の血餅の大きさ (図60D) を示す一連のグラフであり、それぞれ、中程度の表面組織因子密度の条件下で、ARC19499濃度の関数としてプロットした。

【図61】中程度の表面組織因子密度の条件下で、正常なプールされた血漿における遅延時間 (図61A)、 $V_{初期}$ (図61B)、 $V_{定常}$ (図61C)、および60分後の血餅の大きさ (図61D) へのARC19499の影響を説明する一連のグラフである。星印は、統計的に有意な差異±ARC19499 ($P0.05$ 未満) を示す。

【図62】低い表面組織因子密度の条件下で、正常なプールされた血漿 (図62A) 中の血餅増殖と、100nM ARC19499 (図62B) または100nM組換え因子VILa (rVILaもしくはNovoseven (登録商標) を含有する正常なプールされた血漿を比較する。

【図63】空間的凝固モデルからの一連の光散乱画像を示す説明図である。それぞれの列は、0、10、20、30、40、50、および60分間にわたる表面 (下部) からの血餅増殖を示す。最上列は重度の血友病A血漿中の血餅増殖を示し、続いて2列目は、100nM ARC19499を含有する重度の血友病A血漿中の血餅増殖を示し、3列目は、100nM組換え因子VILa (rVILa) を含有する重度の血友病A血漿の血餅増殖を示す。

【図64】正常な血漿 (濃灰色、点線)、重度の血友病A血漿 (黒色、実線)、100nM ARC19499 (薄灰色、実線) または100nM組換え因子VILa (rVILa) (薄灰色、点線) を含有する重度の血友病A血漿中の、時間に対する血餅の大きさのグラフである。

【図65】空間的血栓形成実験のために血漿試料を得た血友病A患者の人口動態を要約する表である。

【図66】低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者1由来の重度の血友病A血漿に滴定されたARC19499または組換え因子VILa (rVILa) の影響を示す。遅延時間へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図66Aおよび図66Bに示され、一方で、 $V_{初期}$ へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図66Cおよび図66Dに示される。

【図67A】図67。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者2由来の重度の血友病A血漿に滴定されたARC19499または組換え因子VILa (rVILa) の影響を示す。遅延時間へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Aおよび図67Bに示され、一方で、 $V_{初期}$ へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Cおよび図67Dに示される。

【図67B】図67。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者2由来の重度の血友病A血漿に滴定されたARC19499または組換え因子VILa (rVILa) の影響を示す。遅延時間へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Aおよび図67Bに示され、一方で、 $V_{初期}$ へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Cおよび図67Dに示される。

【図67C】図67。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者2由来の重度の血友病A血漿に滴定されたARC19499または組換え因子VILa (rVILa) の影響を示す。遅延時間へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Aおよび図67Bに示され、一方で、 $V_{初期}$ へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Cおよび図67Dに示される。

【図67D】図67。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者2由来の重度の血友病A血漿に滴定されたARC19499または組換え因子VILa (rVILa) の影響を示す。遅延時間へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Aおよび図67Bに示され、一方で、 $V_{初期}$ へのARC19499およびrVILaの影響は、それぞれ、図67Cおよび図67Dに示される。

【図68A】図68。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者3由来の重度の血友病A血漿に滴定されたARC19499または組換え因子VILa (r

10

20

30

40

50

V I I a) の影響を示す。遅延時間への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 A および図 6 8 B に示され、一方で、V_{初期} への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 C および図 6 8 D に示される。

【図 6 8 B】図 6 8。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者 3 由来の重度の血友病 A 血漿に滴定された A R C 1 9 4 9 9 または組換え因子 V I I a (r V I I a) の影響を示す。遅延時間への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 A および図 6 8 B に示され、一方で、V_{初期} への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 C および図 6 8 D に示される。

【図 6 8 C】図 6 8。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者 3 由来の重度の血友病 A 血漿に滴定された A R C 1 9 4 9 9 または組換え因子 V I I a (r V I I a) の影響を示す。遅延時間への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 A および図 6 8 B に示され、一方で、V_{初期} への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 C および図 6 8 D に示される。

【図 6 8 D】図 6 8。低い表面組織因子密度で活性化された空間的血栓形成への、患者 3 由来の重度の血友病 A 血漿に滴定された A R C 1 9 4 9 9 または組換え因子 V I I a (r V I I a) の影響を示す。遅延時間への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 A および図 6 8 B に示され、一方で、V_{初期} への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響は、それぞれ、図 6 8 C および図 6 8 D に示される。

【図 6 9】低い表面組織因子密度で活性化された患者 1 ~ 3 由来の血友病 A 血漿試料における V_{定常} への、A R C 1 9 4 9 9 (黒色の記号) または組換え因子 V I I a (r V I I a、灰色の記号) の影響を示す。

【図 7 0】低い表面組織因子密度で活性化された患者 1 ~ 3 由来の血友病 A 血漿試料における 6 0 分間時点での血餅の大きさへの、A R C 1 9 4 9 9 (図 7 0 A) または組換え因子 V I I a (r V I I a、図 7 0 B) の影響を示す。

【図 7 1 A】図 7 1。低い表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿における平均遅延時間 (図 7 1 A)、V_{初期} (図 7 1 B)、V_{定常} (図 7 1 C)、および 6 0 分後の血餅の大きさ (図 7 1 D) への 3 0 0 nM A R C 1 9 4 9 9 の影響を説明する一連のグラフである (n = 3)。星印は、統計的に有意な差異 ± A R C 1 9 4 9 9 (P 0. 0 5 未満) を示す。

【図 7 1 B】図 7 1。低い表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿における平均遅延時間 (図 7 1 A)、V_{初期} (図 7 1 B)、V_{定常} (図 7 1 C)、および 6 0 分後の血餅の大きさ (図 7 1 D) への 3 0 0 nM A R C 1 9 4 9 9 の影響を説明する一連のグラフである (n = 3)。星印は、統計的に有意な差異 ± A R C 1 9 4 9 9 (P 0. 0 5 未満) を示す。

【図 7 1 C】図 7 1。低い表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿における平均遅延時間 (図 7 1 A)、V_{初期} (図 7 1 B)、V_{定常} (図 7 1 C)、および 6 0 分後の血餅の大きさ (図 7 1 D) への 3 0 0 nM A R C 1 9 4 9 9 の影響を説明する一連のグラフである (n = 3)。星印は、統計的に有意な差異 ± A R C 1 9 4 9 9 (P 0. 0 5 未満) を示す。

【図 7 1 D】図 7 1。低い表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿における平均遅延時間 (図 7 1 A)、V_{初期} (図 7 1 B)、V_{定常} (図 7 1 C)、および 6 0 分後の血餅の大きさ (図 7 1 D) への 3 0 0 nM A R C 1 9 4 9 9 の影響を説明する一連のグラフである (n = 3)。星印は、統計的に有意な差異 ± A R C 1 9 4 9 9 (P 0. 0 5 未満) を示す。

【図 7 2 A】図 7 2。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 4 由来の血友病 A 血漿における遅延時間 (図 7 2 A)、V_{初期} (図 7 2 B)、V_{定常} (図 7 2 C)、および 6 0 分後の血餅の大きさ (図 7 2 D) を示す一連のグラフである。各パラメータを、A R C 1 9 4 9 9 (四角形) または組換え因子 V I I a (r V I I a、円形) の関数としてプロットする。

【図 7 2 B】図 7 2。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 4 由来の血友病 A 血

10

20

30

40

50

漿における遅延時間（図 7 2 A）、 $V_{初期}$ （図 7 2 B）、 $V_{定常}$ （図 7 2 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 2 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 2 C】図 7 2。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 4 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 2 A）、 $V_{初期}$ （図 7 2 B）、 $V_{定常}$ （図 7 2 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 2 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 2 D】図 7 2。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 4 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 2 A）、 $V_{初期}$ （図 7 2 B）、 $V_{定常}$ （図 7 2 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 2 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 3 A】図 7 3。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 5 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 3 A）、 $V_{初期}$ （図 7 3 B）、 $V_{定常}$ （図 7 3 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 3 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 3 B】図 7 3。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 5 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 3 A）、 $V_{初期}$ （図 7 3 B）、 $V_{定常}$ （図 7 3 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 3 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 3 C】図 7 3。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 5 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 3 A）、 $V_{初期}$ （図 7 3 B）、 $V_{定常}$ （図 7 3 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 3 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 3 D】図 7 3。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 5 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 3 A）、 $V_{初期}$ （図 7 3 B）、 $V_{定常}$ （図 7 3 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 3 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 4 A】図 7 4。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 4 A）、 $V_{初期}$ （図 7 4 B）、 $V_{定常}$ （図 7 4 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 4 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 4 B】図 7 4。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 4 A）、 $V_{初期}$ （図 7 4 B）、 $V_{定常}$ （図 7 4 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 4 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 4 C】図 7 4。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における遅延時間（図 7 4 A）、 $V_{初期}$ （図 7 4 B）、 $V_{定常}$ （図 7 4 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 4 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、 ARC_{19499} （四角形）または組換え因子 $VIIa$ （ $rVIIa$ 、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 4 D】図 7 4。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血

10

20

30

40

50

漿における遅延時間（図 7 4 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 4 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 4 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 4 D）を示す一連のグラフである。各パラメータを、ARC 19499（四角形）または組織因子 V I I a（r V I I a、円形）の関数としてプロットする。

【図 7 5 A】図 7 5。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における平均遅延時間（図 7 5 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 5 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 5 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 5 D）を示す一連のグラフである（ $n = 3$ ）。

【図 7 5 B】図 7 5。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における平均遅延時間（図 7 5 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 5 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 5 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 5 D）を示す一連のグラフである（ $n = 3$ ）。

【図 7 5 C】図 7 5。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における平均遅延時間（図 7 5 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 5 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 5 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 5 D）を示す一連のグラフである（ $n = 3$ ）。

【図 7 5 D】図 7 5。中程度の表面組織因子密度で活性化された患者 6 由来の血友病 A 血漿における平均遅延時間（図 7 5 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 5 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 5 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 5 D）を示す一連のグラフである（ $n = 3$ ）。

【図 7 6 A】図 7 6。中程度の表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿と 300 nM ARC 19499 を含有する血友病 A 血漿とを比較した正常な血漿における、遅延時間（図 7 6 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 6 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 6 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 6 D）を示す一連のグラフである。

【図 7 6 B】図 7 6。中程度の表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿と 300 nM ARC 19499 を含有する血友病 A 血漿とを比較した正常な血漿における、遅延時間（図 7 6 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 6 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 6 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 6 D）を示す一連のグラフである。

【図 7 6 C】図 7 6。中程度の表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿と 300 nM ARC 19499 を含有する血友病 A 血漿とを比較した正常な血漿における、遅延時間（図 7 6 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 6 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 6 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 6 D）を示す一連のグラフである。

【図 7 6 D】図 7 6。中程度の表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿と 300 nM ARC 19499 を含有する血友病 A 血漿とを比較した正常な血漿における、遅延時間（図 7 6 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 6 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 6 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 6 D）を示す一連のグラフである。

【図 7 7】遅延時間（白色）、 $V_{\text{初期}}$ （薄灰色）、 $V_{\text{定常}}$ （中程度の灰色）、および 60 分後の血餅の大きさ（黒色）で表されるように、血友病 A 血漿（斜線バー）に対する正常な血漿（実線バー）における血餅増殖を促進する ARC 19499 の効率を説明する棒グラフである。効率は、300 nM ARC 19499 の存在下で決定されるパラメータと、ARC 19499 の不在下でのパラメータとの比率と定義される。

【図 7 8】低い表面組織因子密度で活性化された血友病 A 血漿中の ARC 19499 への遅延時間（図 7 8 A）および 60 分時点での血餅の大きさ（図 7 8 B）の濃度依存性を説明する。これらのデータを用いて、グラフの下に示される IC_{50} 値を計算した。

【図 7 9】低い表面組織因子密度で活性化された、300 nM ARC 19499 または 300 nM 組織因子 V I I a（r V I I a）を含有する血友病 A 血漿と比較した、血友病 A 血漿のみににおける遅延時間（図 7 9 A）、 $V_{\text{初期}}$ （図 7 9 B）、 $V_{\text{定常}}$ （図 7 9 C）、および 60 分後の血餅の大きさ（図 7 9 D）を説明する一連のグラフである。

【図 8 0】低い表面組織因子密度で活性化された T F P I が枯渇した血漿における遅延時間（図 8 0 A）と $V_{\text{初期}}$ （図 8 0 B）とを比較する。それぞれのグラフは、T F P I が枯渇した血漿のみ（「P B S」）、 ± 10 nM 組織因子 T F P I（「T F P I」）で補充した T F P I が枯渇した血漿、300 nM ARC 19499 を含有する T F P I が枯渇した血漿（「A R C」）、ならびに 10 nM 組織因子 T F P I および 300 nM ARC 19499 で補充した T F P I が枯渇した血漿（「A R C + T F P I」）において測定されたパ

10

20

30

40

50

ラメータを示す。

【図 8 1】正常な重度の血友病 B 個人および重度の血友病 A 個人由来の全血試料における、TF-活性凝固時間 (TF-ACT) アッセイへの ARC 19499 の影響を示す一連の表である。

【図 8 2】正常な重度の血友病 B 個人および重度の血友病 A 個人由来の全血試料における、希釈プロトロンビン時間 (dPT) アッセイへの ARC 19499 の影響を示す一連の表である。

【図 8 3】血友病患者 (塗りつぶされた四角形) および健常な対照 (塗りつぶされていない円形) 由来の (トウモロコシトリプシン阻害剤 (CTI) を有さない) 全血試料における、ROTEM パラメータへの異なる ARC 19499 濃度の影響を示す。以下のパラメータ: 凝固時間 (CT)、血栓形成時間 (CFT)、最大血餅硬度 (MCF)、およびアルファ角度 (アルファ) を分析した。

10

【図 8 4】FVII レベル: 1%未満 (塗りつぶされた四角形)、1~5% (塗りつぶされた逆三角形)、5%超 (塗りつぶされた三角形) に従って階級化した血友病 A 患者と比較した、健常な対照 (塗りつぶされていない円形) 由来の血液試料における、凝固時間 (CT) への異なる ARC 19499 濃度の影響を示す。斜線領域は、健常な対照の範囲を示す。

【図 8 5】血友病患者 (塗りつぶされた四角形) および健常な対照 (塗りつぶされていない円形) 由来の (トウモロコシトリプシン阻害剤 (CTI) を有する) 全血試料における、ROTEM パラメータへの異なる ARC 19499 濃度の影響を示す。以下のパラメータ: 凝固時間 (CT)、血栓形成時間 (CFT)、最大血餅硬度 (MCF)、およびアルファ角度 (アルファ) を分析した。

20

【図 8 6】後天性血友病 A を有する 1 人の患者由来の全血試料における、ROTEM パラメータへの異なる ARC 19499 濃度の影響を示す。以下のパラメータ: 凝固時間 (CT)、血栓形成時間 (CFT)、最大血餅硬度 (MCF)、およびアルファ角度 (アルファ) を分析した。

【図 8 7】中和 FVII 抗体とともに事前にインキュベートされた健常な対照血液の ROTEM パラメータを示す。グラフは、同一の対照における凝固時間 (CT) (左パネル) および血栓形成時間 (CFT) (右パネル) を示し、それぞれのグラフの左側に、FVII 抗体による阻害後の値が示される。

30

【図 8 8】代表的な重度の血友病 A 患者 (左パネル) および健常な対照 (右パネル) 由来の血漿における自動校正トロンビン生成 (CAT) アッセイからのトロンビン生成曲線を示す。両グラフは、200 nM ARC 19499 の存在下 (塗りつぶされていない円形) および不在下 (塗りつぶされた四角形) での結果を示す。

【図 8 9】内因性トロンビン生成能 (ETP)、ピークまでの時間、ピークトロンビン濃度、およびスタートテールを含む、ARC 19499 濃度に対する自動校正トロンビン生成 (CAT) パラメータのプロットを示す。それぞれのグラフにおいて、血友病患者 (塗りつぶされた四角形) 由来の血漿における ARC 19499 への応答を、健常な対照 (塗りつぶされていない円形) と比較する。

【図 9 0】血友病患者 (塗りつぶされた四角形) における応答を、健常な対照 (塗りつぶされていない円形) における応答と比較した、ARC 19499 濃度に対する自動校正トロンビン生成 (CAT) 遅延時間のプロットである。

40

【図 9 1】FVII レベル: 1%未満 (塗りつぶされた四角形)、1~5% (塗りつぶされた逆三角形)、5%超 (塗りつぶされた三角形) に従って階級化した血友病 A 患者と比較した、健常な対照 (塗りつぶされていない円形) 由来の血漿試料におけるピークトロンビンへの異なる ARC 19499 濃度の影響を示す。斜線領域は、健常な対照において観察された範囲を示す。

【図 9 2】ARC 19499 の 0 nM (塗りつぶされた四角形)、2 nM (星印)、20 nM (塗りつぶされていない円形)、または 200 nM (塗りつぶされた星印) を含有する後天性血友病 A を有する 1 人の患者由来の血漿におけるトロンビン生成曲線を示す。

50

【図 9 3】中和 F V I I I 抗体とともに事前にインキュベートされた健常な対照血漿の自動校正トロンビン生成 (C A T) パラメータを示す。グラフは、同一の対照における内因性トロンビン生成能 (E T P) (左パネル) およびピークトロンビン (右パネル) を示し、それぞれのグラフの左側に、F V I I I 抗体による阻害後の値が示される。

【図 9 4】健常な志願者 (A R C H V 0 1) の代表的な自動校正トロンビン生成 (C A T) データを示す。

【図 9 5】重度の血友病 A を有する患者 (A R C S H A 0 5) の代表的な自動校正トロンビン生成 (C A T) データを示す。

【図 9 6】中程度の血友病 A を有する患者 (A R C M o H A 0 1) の代表的な自動校正トロンビン生成 (C A T) データを示す。

【図 9 7】軽度の血友病 A を有する患者 (A R C M i H A 0 3) の代表的な自動校正トロンビン生成 (C A T) データを示す。

【図 9 8 - 1】図 9 8。健常な対照 (塗りつぶされた円形) と比較した、重度の血友病 A (塗りつぶされていないひし形)、中程度の血友病 A (塗りつぶされていない四角形)、軽度の血友病 A (塗りつぶされていない三角形)、または重度の血友病 B (塗りつぶされた三角形) を有する患者由来の新鮮な血漿試料において測定された、平均自動校正トロンビン生成 (C A T) パラメータ (内因性トロンビン生成能 (E T P)、ピークトロンビン、遅延時間、およびピークまでの時間) を示す一連のグラフである。

【図 9 8 - 2】図 9 8。健常な対照 (塗りつぶされた円形) と比較した、重度の血友病 A (塗りつぶされていないひし形)、中程度の血友病 A (塗りつぶされていない四角形)、軽度の血友病 A (塗りつぶされていない三角形)、または重度の血友病 B (塗りつぶされた三角形) を有する患者由来の新鮮な血漿試料において測定された、平均自動校正トロンビン生成 (C A T) パラメータ (内因性トロンビン生成能 (E T P)、ピークトロンビン、遅延時間、およびピークまでの時間) を示す一連のグラフである。

【図 9 9 - 1】図 9 9。健常な対照 (塗りつぶされた円形) と比較した、重度の血友病 A (塗りつぶされていないひし形)、中程度の血友病 A (塗りつぶされていない四角形)、軽度の血友病 A (塗りつぶされていない三角形)、または重度の血友病 B (塗りつぶされた三角形) を有する患者由来の凍結解凍した血漿試料において測定された、平均自動校正トロンビン生成 (C A T) パラメータ (内因性トロンビン生成能 (E T P)、ピークトロンビン、遅延時間、およびピークまでの時間) を示す一連のグラフである。

【図 9 9 - 2】図 9 9。健常な対照 (塗りつぶされた円形) と比較した、重度の血友病 A (塗りつぶされていないひし形)、中程度の血友病 A (塗りつぶされていない四角形)、軽度の血友病 A (塗りつぶされていない三角形)、または重度の血友病 B (塗りつぶされた三角形) を有する患者由来の凍結解凍した血漿試料において測定された、平均自動校正トロンビン生成 (C A T) パラメータ (内因性トロンビン生成能 (E T P)、ピークトロンビン、遅延時間、およびピークまでの時間) を示す一連のグラフである。

【図 1 0 0】健常な志願者 (A R C H V 0 1) 由来の代表的な全血トロンボエラストグラフィー (T E G (登録商標)) データを示す。

【図 1 0 1】重度の血友病 A を有する患者 (A R C S H A 0 2) の代表的な全血トロンボエラストグラフィー (T E G (登録商標)) データを示す。

【図 1 0 2】中程度の血友病 A を有する患者 (A R C M o H A 0 1) の代表的な全血トロンボエラストグラフィー (T E G (登録商標)) データを示す。

【図 1 0 3】軽度の血友病 A を有する患者 (A R C M i H A 0 1) の代表的な全血トロンボエラストグラフィー (T E G (登録商標)) データを示す。

【図 1 0 4】健常な対照 (塗りつぶされた円形) と比較した、重度の血友病 A (塗りつぶされていないひし形)、中程度の血友病 A (塗りつぶされていない四角形)、軽度の血友病 A (塗りつぶされていない三角形)、または重度の血友病 B (塗りつぶされた三角形) を有する患者由来の全血試料において測定された、平均トロンボエラストグラフィー (T E G (登録商標)) パラメータ (R 時間、K、および角度) を示す一連のグラフである。

【図 1 0 5】重度の血友病 A を有する患者 (A R C S H A 0 2) の代表的な血漿トロ

10

20

30

40

50

ンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））データを示す。

【図106】中程度の血友病Aを有する患者（ARC MoHA 01）の代表的な血漿
トロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））データを示す。

【図107】軽度の血友病Aを有する患者（ARC MiHA 03）の代表的な血漿ト
ロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））データを示す。

【図108】健常な対照（塗りつぶされた円形）と比較した、重度の血友病A（塗りつぶ
されていないひし形）、中程度の血友病A（塗りつぶされていない四角形）、軽度の血友
病A（塗りつぶされていない三角形）、または重度の血友病B（塗りつぶされた三角形）
を有する患者由来の血漿試料において測定された、平均トロンボエラストグラフィー（T
EG（登録商標））パラメータ（R時間、K、および角度）を示す一連のグラフである。

【図109】ARC19499活性を逆転させることができることを示す一連のグラフであ
る。ARC19499（点線）は、内因性トロンビン生成能（ETP、図109A）お
およびピークトロンビン（図109B）で測定される、血友病A血漿のみ（実線）と比較
して、自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイにおけるトロンビン生成を改善した。
ARC23085（塗りつぶされたひし形）、ARC23087（塗りつぶされていない
三角形）、ARC23088（塗りつぶされた四角形）、およびARC23089（塗り
つぶされた三角形）の添加は、100nM以上の濃度でこの改善を逆転させることができ
、ARC19499の不在と同様のレベルに達する。図109Cにおいて、トロンボエラ
ストグラフィー（TEG（登録商標））アッセイからのR値は、500nM ARC19
499が血友病A血漿において延長されたR値を短縮することを示した。1μM ARC
23085は、37℃で5分間の事前インキュベーションの有無にかかわらず、この改善
を部分的に逆転させた。ARC23087は、37℃で5分間の事前インキュベーション
を伴って、この改善を逆転させた。ARC23088は、いずれの条件でもほとんど逆転
を示さなかった。ARC23089は、37℃で5分間の事前インキュベーションを伴っ
て、ARC19499の改善も逆転させた。

【図110A】図110。0.00（図110A）、0.156（図110B）、0.3
12（図110C）、0.625（図110D）、1.25（図110E）、2.50（
図110F）、または5.00IU/mL（図110G）の低分子量ヘパリン（LMWH
）の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビ
ン生成（CAT）アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図110B】図110。0.00（図110A）、0.156（図110B）、0.3
12（図110C）、0.625（図110D）、1.25（図110E）、2.50（
図110F）、または5.00IU/mL（図110G）の低分子量ヘパリン（LMWH
）の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビ
ン生成（CAT）アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図110C】図110。0.00（図110A）、0.156（図110B）、0.3
12（図110C）、0.625（図110D）、1.25（図110E）、2.50（
図110F）、または5.00IU/mL（図110G）の低分子量ヘパリン（LMWH
）の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビ
ン生成（CAT）アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図110D】図110。0.00（図110A）、0.156（図110B）、0.3
12（図110C）、0.625（図110D）、1.25（図110E）、2.50（
図110F）、または5.00IU/mL（図110G）の低分子量ヘパリン（LMWH
）の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビ
ン生成（CAT）アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図110E】図110。0.00（図110A）、0.156（図110B）、0.3
12（図110C）、0.625（図110D）、1.25（図110E）、2.50（
図110F）、または5.00IU/mL（図110G）の低分子量ヘパリン（LMWH
）の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビ
ン生成（CAT）アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図110F】図110。0.00 (図110A)、0.156 (図110B)、0.312 (図110C)、0.625 (図110D)、1.25 (図110E)、2.50 (図110F)、または5.00 IU/mL (図110G)の低分子量ヘパリン (LMWH)の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビン生成 (CAT) アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図110G】図110。0.00 (図110A)、0.156 (図110B)、0.312 (図110C)、0.625 (図110D)、1.25 (図110E)、2.50 (図110F)、または5.00 IU/mL (図110G)の低分子量ヘパリン (LMWH)の存在下での、血友病A血漿におけるARC19499の活性を示す自動校正トロンビン生成 (CAT) アッセイからの一連のトロンビン生成曲線である。

【図111】血友病A血漿においてARC19499およびLMWHの両方の増加した濃度で実行された自動校正トロンビン生成 (CAT) アッセイからの内因性トロンビン生成能 (ETP、図111A) およびピークトロンビン (図111B) を示す一連のグラフである。LMWHの濃度は、IU/mLの単位でx軸上に示される。LMWHの治療用量 (1.25 IU/mL以上) で、ARC19499の凝固促進活性を逆転させた。

【図112】血友病A血漿においてARC19499およびLMWHの両方の増加した濃度で実行された自動校正トロンビン生成 (CAT) アッセイからの内因性トロンビン生成能 (ETP、図112A) およびピークトロンビン (図112B) を示す一連のグラフである。LMWHの濃度は、μMの単位でx軸上に示される。これらのグラフにおけるデータを曲線適合により分析し、様々なARC19499濃度の存在下におけるLMWH IC₅₀の推定値を生成した。IC₅₀値を、グラフの下で表で見出すことができる。

【図113A】図113。血清におけるいくつかのTFPIアプタマーのインビトロでの安定性を示す一連のグラフである。ヒト、サル、およびラット血清におけるARC19498 (図113A)、ARC19499 (図113B)、ARC19500 (図113C)、ARC19501 (図113D)、ARC19881 (図113E)、およびARC19882 (図113F)の安定性を、72時間にわたって測定した。

【図113B】図113。血清におけるいくつかのTFPIアプタマーのインビトロでの安定性を示す一連のグラフである。ヒト、サル、およびラット血清におけるARC19498 (図113A)、ARC19499 (図113B)、ARC19500 (図113C)、ARC19501 (図113D)、ARC19881 (図113E)、およびARC19882 (図113F)の安定性を、72時間にわたって測定した。

【図113C】図113。血清におけるいくつかのTFPIアプタマーのインビトロでの安定性を示す一連のグラフである。ヒト、サル、およびラット血清におけるARC19498 (図113A)、ARC19499 (図113B)、ARC19500 (図113C)、ARC19501 (図113D)、ARC19881 (図113E)、およびARC19882 (図113F)の安定性を、72時間にわたって測定した。

【図113D】図113。血清におけるいくつかのTFPIアプタマーのインビトロでの安定性を示す一連のグラフである。ヒト、サル、およびラット血清におけるARC19498 (図113A)、ARC19499 (図113B)、ARC19500 (図113C)、ARC19501 (図113D)、ARC19881 (図113E)、およびARC19882 (図113F)の安定性を、72時間にわたって測定した。

【図113E】図113。血清におけるいくつかのTFPIアプタマーのインビトロでの安定性を示す一連のグラフである。ヒト、サル、およびラット血清におけるARC19498 (図113A)、ARC19499 (図113B)、ARC19500 (図113C)、ARC19501 (図113D)、ARC19881 (図113E)、およびARC19882 (図113F)の安定性を、72時間にわたって測定した。

【図113F】図113。血清におけるいくつかのTFPIアプタマーのインビトロでの安定性を示す一連のグラフである。ヒト、サル、およびラット血清におけるARC19498 (図113A)、ARC19499 (図113B)、ARC19500 (図113C)、ARC19501 (図113D)、ARC19881 (図113E)、およびARC

10

20

30

40

50

19882 (図113F)の安定性を、72時間にわたって測定した。

【図114】抗ヒトFV I I I抗体で事前に処理されたカニクイザル由来の血漿を、増加した濃度のARC19499と混合させ、活性についてアッセイした、トロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) アッセイのグラフである。双方ともにアプタマーの不在下において、実線は、未処理のサル由来の血漿を示し、点線は、抗体で処理されたサル由来の血漿を示す。データは平均±標準誤差を示し、陰影部分は、アプタマーなしの試料の標準誤差を示す。

【図115】カニクイザルの第V I I I因子抗体注入後の処理の有無にかかわらず、第V I I I因子活性が1%未満まで減少し、研究期間の間 (5.5時間)、そのままの状態であったことを示すグラフである。データは、平均±標準誤差、 $n=3\sim6$ を示す。

【図116】カニクイザルのARC19499処理の前および後のプロトロンビン (PT) および活性化部分トロンボプラスチン (aPTT) 時間を示す一連のグラフである。

【図117A】図117。生理食塩水 (塗りつぶされた三角形)、NovoSeven (登録商標) (×)、 $600\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていない四角形)、 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていない三角形)、または $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていないひし形) で処理されたサルにおいて決定された、凝固時間の測定であるR値 (図117A)、血栓形成速度の測定である角度 (図117B)、および血餅強度の測定である最大振幅 (MA、図117C) を示すトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) 分析からの一連のグラフである。本研究の経時変化は、x軸上に示される。データは、平均±標準誤差、 $n=3\sim6$ を示す。

【図117B】図117。生理食塩水 (塗りつぶされた三角形)、NovoSeven (登録商標) (×)、 $600\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていない四角形)、 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていない三角形)、または $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていないひし形) で処理されたサルにおいて決定された、凝固時間の測定であるR値 (図117A)、血栓形成速度の測定である角度 (図117B)、および血餅強度の測定である最大振幅 (MA、図117C) を示すトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) 分析からの一連のグラフである。本研究の経時変化は、x軸上に示される。データは、平均±標準誤差、 $n=3\sim6$ を示す。

【図117C】図117。生理食塩水 (塗りつぶされた三角形)、NovoSeven (登録商標) (×)、 $600\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていない四角形)、 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていない三角形)、または $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (塗りつぶされていないひし形) で処理されたサルにおいて決定された、凝固時間の測定であるR値 (図117A)、血栓形成速度の測定である角度 (図117B)、および血餅強度の測定である最大振幅 (MA、図117C) を示すトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) 分析からの一連のグラフである。本研究の経時変化は、x軸上に示される。データは、平均±標準誤差、 $n=3\sim6$ を示す。

【図118A】図118。図117よりも長い時間、NovoSeven (登録商標) (×) または $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (三角形) で処理された追加のサルにおいて決定された、凝固時間の測定であるR値 (図118A)、血栓形成速度の測定である角度 (図118B)、および血餅強度の測定である最大振幅 (MA、図118C) を示すトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) 分析からの一連のグラフである。本研究の経時変化は、x軸上に示される。データは、NovoSeven (登録商標) 処理において平均±標準誤差、 $n=5$ 、ARC19499処理において $n=6$ を示す。

【図118B】図118。図117よりも長い時間、NovoSeven (登録商標) (×) または $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 (三角形) で処理された追加のサルにおいて決定された、凝固時間の測定であるR値 (図118A)、血栓形成速度の測定である角度 (図118B)、および血餅強度の測定である最大振幅 (MA、図118C) を示すトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) 分析からの一連のグラフである。本研究の経時変化は、x軸上に示される。データは、NovoSeven (登録商標) 処理において平均±標準誤差、 $n=5$ 、ARC19499処理において $n=6$ を示す。

【図118C】図118。図117よりも長い時間、NovoSeven（登録商標）（×）または300 μg/kg ARC19499（三角形）で処理された追加のサルにおいて決定された、凝固時間の測定であるR値（図118A）、血栓形成速度の測定である角度（図118B）、および血餅強度の測定である最大振幅（MA、図118C）を示すトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））分析からの一連のグラフである。本研究の経時変化は、x軸に示される。データは、NovoSeven（登録商標）処理において平均±標準誤差、n=5、ARC19499処理においてn=6を示す。

【図119】ARC19499の20 mg/kg 静脈内（IV、実線）または皮下（SC、斜線）投与後のカニクイザルにおけるTFPIレベルをnM単位でy軸に示すグラフである。経時変化は、x軸に示される。TFPI放出のパターンは、IVおよびSC投与の両方において非常に類似した。データは、平均±標準誤差、n=3を示す。

【図120】非ヒト霊長類（NHP）出血モデルにおける出血時間の評価ならびに関連したFVII抗体およびARC19499投与ならびに血液サンプリングのスケジュールを示す。

【図121A】図121。FVII抗体およびARC19499で処理されたカニクイザルの様々な投薬群由来の血漿試料におけるFVII活性レベルを示す一連のグラフである：出血時間を1回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第1群のサル（図121A）、出血時間を2回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第2群のサル（図121B）、出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第3群のサル（図121C）、および出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正しなかった第4群のサル（図121D）。

【図121B】図121。FVII抗体およびARC19499で処理されたカニクイザルの様々な投薬群由来の血漿試料におけるFVII活性レベルを示す一連のグラフである：出血時間を1回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第1群のサル（図121A）、出血時間を2回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第2群のサル（図121B）、出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第3群のサル（図121C）、および出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正しなかった第4群のサル（図121D）。

【図121C】図121。FVII抗体およびARC19499で処理されたカニクイザルの様々な投薬群由来の血漿試料におけるFVII活性レベルを示す一連のグラフである：出血時間を1回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第1群のサル（図121A）、出血時間を2回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第2群のサル（図121B）、出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第3群のサル（図121C）、および出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正しなかった第4群のサル（図121D）。

【図121D】図121。FVII抗体およびARC19499で処理されたカニクイザルの様々な投薬群由来の血漿試料におけるFVII活性レベルを示す一連のグラフである：出血時間を1回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第1群のサル（図121A）、出血時間を2回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第2群のサル（図121B）、出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正した第3群のサル（図121C）、および出血時間を3回用量の1 mg/kg ARC19499で補正しなかった第4群のサル（図121D）。

【図122】秒単位（図122A）および%でのベースライン出血時間（図122B）の第1群のサルの平均出血時間を示す。

【図123】秒単位（図123A）および%でのベースライン出血時間（図123B）の第1群のサルの個々の出血時間を示す。

【図124】秒単位（図124A）および%でのベースライン出血時間（図124B）の第2群のサルの平均出血時間を示す。

【図125】秒単位（図125A）および%でのベースライン出血時間（図125B）の第2群のサルの個々の出血時間を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 2 6】秒単位（図 1 2 6 A）および%でのベースライン出血時間（図 1 2 6 B）の第 3 群のサルの出血時間を示す。

【図 1 2 7】秒単位（図 1 2 7 A）および%でのベースライン出血時間（図 1 2 7 B）の第 4 群のサルの出血時間を示す。

【図 1 2 8】第 1 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された群平均 R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 2 9】第 1 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

10

【図 1 3 0】第 2 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された群平均 R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 3 1】第 2 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

20

【図 1 3 2】第 3 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 3 3】第 4 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、全血のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 3 4】第 1 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、血漿のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された群平均 R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

30

【図 1 3 5】第 1 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、血漿のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 3 6】第 2 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、血漿のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された群平均 R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

40

【図 1 3 7】第 2 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、血漿のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 3 8】第 3 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、血漿のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第 V I I I 因子抗体の投与時間は正記号（+）で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印（*）で示される。

【図 1 3 9】第 4 群のサルのサンプリング時点に対してプロットした、血漿のトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定された個々の R 値のグラフである。抗第

50

V I I I 因子抗体の投与時間は正記号 (+) で示され、A R C 1 9 4 9 9 の投与時間は星印 (*) で示される。

【図 1 4 0 - 1】図 1 4 0。A R C 1 7 4 8 0 配列において単一および複数の 2' - 置換を含有する A R C 1 7 4 8 0 の誘導体を示す。A R C 1 7 4 8 0 との差異は影付きの部分である。

【図 1 4 0 - 2】図 1 4 0。A R C 1 7 4 8 0 配列において単一および複数の 2' - 置換を含有する A R C 1 7 4 8 0 の誘導体を示す。A R C 1 7 4 8 0 との差異は影付きの部分である。

【図 1 4 1 - 1】図 1 4 1。A R C 1 7 4 8 0 配列中の残基のそれぞれの対の間に単一のホスホロチオエート置換を含有する A R C 1 7 4 8 0 の誘導体を示す。それぞれのホスホロチオエートは、配列中の残基の対の間に「s」で示される。A R C 1 7 4 8 0 との差異は影付きの部分である。

【図 1 4 1 - 2】図 1 4 1。A R C 1 7 4 8 0 配列中の残基のそれぞれの対の間に単一のホスホロチオエート置換を含有する A R C 1 7 4 8 0 の誘導体を示す。それぞれのホスホロチオエートは、配列中の残基の対の間に「s」で示される。A R C 1 7 4 8 0 との差異は影付きの部分である。

【図 1 4 2】図 1 4 2 A は、A R C 1 7 4 8 0 の推定上の二次構造にマッピングされる、耐性を示す 2' 置換および耐性を示さない 2' 置換を示す。図 1 4 2 B は、A R C 1 7 4 8 0 の 4 個のデオキシチジン残基 (残基 9、14、16、および 25) で 2' - デオキシから 2' - Oメチルおよび / または 2' - フルオロへの複数の置換を伴う活性 A R C 1 7 4 8 0 誘導体を示す。

【図 1 4 3 - 1】図 1 4 3。A R C 1 7 4 8 0 配列における単一または複数の欠失を含有する A R C 1 7 4 8 0 の誘導体を示す。A R C 1 7 4 8 0 との差異は、黒色で強調されている。

【図 1 4 3 - 2】図 1 4 3。A R C 1 7 4 8 0 配列における単一または複数の欠失を含有する A R C 1 7 4 8 0 の誘導体を示す。A R C 1 7 4 8 0 との差異は、黒色で強調されている。

【図 1 4 4 A】図 1 4 4 A は、A R C 1 7 4 8 0 の推定上の二次構造にマッピングされる、耐性を示す単一の残基欠失および耐性を示さない単一の残基欠失を示す。A R C 1 7 4 8 0 は、2' - Oメチル (円形) および 2' - デオキシ (四角形) ヌクレオチドから成り、その 3' 末端において逆位のデオキシチミジン残基 (3 T) で修飾される。隣接ヌクレオチドが同一である場合に備えて、対応する二重残基欠失も示される。耐性を示す欠失は灰色で強調され、耐性を示さない欠失は黒色で強調されている。耐性を示す二重欠失および耐性を示さない二重欠失が示される。図 1 4 4 B は、活性 A R C 1 7 4 8 0 誘導体である、A R C 3 3 8 8 9 および A R C 3 3 8 9 5 を示す。これらの分子はそれぞれ、欠失した 7 個の A R C 1 7 4 8 0 残基を有し、それらは黒色の円形で示される。

【図 1 4 4 B】A R C 1 7 4 8 0 の推定上の二次構造にマッピングされる、耐性を示す単一の残基欠失および耐性を示さない単一の残基欠失を示す。A R C 1 7 4 8 0 は、2' - Oメチル (円形) および 2' - デオキシ (四角形) ヌクレオチドから成り、その 3' 末端において逆位のデオキシチミジン残基 (3 T) で修飾される。隣接ヌクレオチドが同一である場合に備えて、対応する二重残基欠失も示される。耐性を示す欠失は灰色で強調され、耐性を示さない欠失は黒色で強調されている。耐性を示す二重欠失および耐性を示さない二重欠失が示される。図 1 4 4 B は、活性 A R C 1 7 4 8 0 誘導体である、A R C 3 3 8 8 9 および A R C 3 3 8 9 5 を示す。これらの分子はそれぞれ、欠失した 7 個の A R C 1 7 4 8 0 残基を有し、それらは黒色の円形で示される。

【図 1 4 5】3' 切断型 A R C 1 9 4 9 9 誘導体でのトロンビン生成実験の結果を示す。内因性トロンビン生成能 (E T P、図 1 4 5 A) およびピークトロンビン (図 1 4 5 B) で測定される、A R C 1 9 4 9 9、A R C 2 1 3 8 3、A R C 2 1 3 8 5、A R C 2 1 3 8 7、および A R C 2 1 3 8 9 は全て、濃度依存的様式で血友病 A 血漿中のトロンビン生成を増加させる。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0096】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細が、下に添付の記述において説明される。本明細書に記載の方法および物質と同様または同等の任意の方法および物質を本発明の実践および試験において使用することができるが、好ましい方法および物質をこれから説明する。本発明の他の特性、目的、および利点は、記述から明らかになる。記述において、単数形は、文脈が別途明確に示さない限り、複数形も含む。別途定義されない限り、本明細書で使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者により一般的に理解される意味と同一の意味を有する。不一致が生じる場合、本記述を調節する。

【0097】

本発明は、本明細書で「TFPI アプタマー」と記載されるTFPIに結合するアプタマー、ならびに場合によっては他の作用物質を用いて、出血障害および他のTFPIによって媒介される病状、疾患、または障害の治療においてそのようなアプタマーを用いるための方法を提供する。加えて、合併症またはその副作用を軽減するか、またはさもなければその進行を遅延させるために、場合によっては他の作用物質を伴って、TFPI アプタマーを、医学的手技の前、間、および／または後に用いることができる。

【0098】

アプタマーの特定

本明細書に記載のアプタマーは、好ましくは、概して図4に示される、Exponential EnrichmentのSystematic Evolution of LigandsまたはSELEX（商標）として当技術分野で既知の方法を介して特定される。より具体的には、核酸の出発プールを含有する混合物に始まって、SELEX（商標）法は、（a）結合にとって好ましい条件下で混合物を標的と接触させるステップ、（b）未結合核酸を標的に結合した核酸から分配するステップ、（c）結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、（d）所望の回数の周期で、接触、分配、および増幅するステップを繰り返して、標的に対して非常に特異的な高親和性アプタマーを産出するステップを含む。RNAアプタマー等の転写されたアプタマーが選択される場合、SELEX（商標）法の増幅ステップは、（i）核酸標的複合体から解離される核酸を逆転写するか、またはさもなければ配列情報に対応するDNA配列に伝達するステップ、（i i）PCR増幅のステップ、および（i i i）本プロセスを再開する前に、PCRで増幅された核酸を転写するか、またはさもなければ配列情報に対応するRNA配列に伝達するステップを含む。核酸の出発プールは、修飾または未修飾DNA、RNA、またはDNA/RNAハイブリッドであってもよく、許容される修飾は、塩基、糖類、および／またはヌクレオチド間連結での修飾を含む。出発プールの組成物は、最終アプタマーの所望の性質によって決まる。選択を、例えば、インビボ分解に対してアプタマーを安定化させるために修飾ヌクレオチドを組み込む核酸配列により実行することができる。例えば、ヌクレアーゼ分解への耐性を、2'位置での修飾基の組み込みにより大いに増加することができる。

【0099】

一実施形態において、本発明は、全ての塩基での単一の2'置換またはアデノシン三リン酸（ATP）、グアノシン三リン酸（GTP）、シチジン三リン酸（CTP）、チミジン三リン酸（TTP）、およびウリジン三リン酸（UTP）ヌクレオチドの2'-OH、2'-F、2'-デオキシ、2'-NH₂、および2'-OMe修飾の組み合わせを含むアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、ATP、GTP、CTP、TTP、およびUTPヌクレオチドの2'-OH、2'-F、2'-デオキシ、2'-OMe、2'-NH₂、および2'-メトキシエチル修飾の組み合わせを含むアプタマーを提供する。さらなる実施形態において、本発明は、全てもしくは実質的に全ての2'-OMeで修飾されたATP、GTP、CTP、TTP、および／またはUTPヌクレオチドを含むアプタマーを提供する。

【0100】

いくつかの実施形態において、本発明の2'-修飾アプタマーは、修飾されたポリメラーゼ、例えば、野生型ポリメラーゼの組み込み率よりも高い、フラノースの2'位置に巨大な置換基を有する修飾ヌクレオチドの組み込み率を有する修飾されたRNAポリメラーゼを用いて作成される。一実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがフェニルアラニンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639F)である。別の実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがフェニルアラニンに変化し、位置378のリジンがアルギニンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639F/K378R)である。さらに別の実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがフェニルアラニンに変化し、位置784のヒスチジンがアラニンに変化し、位置378のリジンがアルギニンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639F/H784A/K378R)であり、転写反応混合物は、転写のために2'-OH GTPの添加を必要とする。さらなる実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがフェニルアラニンに変化し、位置784のヒスチジンがアラニンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639F/H784A)である。

10

20

30

40

50

【0101】

一実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがロイシンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639L)である。別の実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがロイシンに変化し、位置784のヒスチジンがアラニンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639L/H784A)である。さらに別の実施形態において、修飾されたRNAポリメラーゼは、位置639のチロシンがロイシンに変化し、ヒスチジンが位置784でアラニンに変化し、位置378のリジンがアルギニンに変化した変異体T7ポリメラーゼ(Y639L/H784A/K378R)である。

【0102】

野生型ポリメラーゼの組み込み率よりも高い、フラノース2'位置で巨大な置換基を有する修飾ヌクレオチドの組み込み率を有する別の好適なRNAポリメラーゼは、例えば、変異体T3RNAポリメラーゼである。一実施形態において、変異体T3RNAポリメラーゼは位置640で変異を有し、位置640のチロシンはフェニルアラニンに置換される(Y640F)。別の実施形態において、変異体T3RNAポリメラーゼは、位置640および785で変異を有し、位置640のチロシンはロイシンに置換され、位置785のヒスチジンはアラニンに置換される(Y640L/H785A)。

【0103】

2'修飾オリゴヌクレオチドを、全ての修飾ヌクレオチドまたは一部の修飾ヌクレオチドで合成することができる。本修飾は、同一であるか、あるいは異なる。いくつかまたは全てのヌクレオチドを修飾することができ、修飾されるヌクレオチドは、同一の修飾を含有し得る。例えば、同一の塩基を含有する全てのヌクレオチドは、1種類の修飾を有し得る一方で、他の塩基を含有するヌクレオチドは、異なる種類の修飾を有し得る。全てのプリンヌクレオチドは、1種類の修飾を有し得る(か、あるいは修飾されない)一方で、全てのピリミジンヌクレオチドは、別の異なる種類の修飾を有し得る(か、あるいは修飾されない)。このようにして、転写物、または転写物のプールは、例えば、リボヌクレオチド(2'-OH)、デオキシリボヌクレオチド(2'-デオキシ)、2'-アミノヌクレオチド(2'-NH₂)、2'-フルオロヌクレオチド(2'-F)、および2'-オームethyl(2'-OMe)ヌクレオチドを含む任意の修飾の組み合わせを用いて生成される。

【0104】

本明細書で使用される、2'-OMe A、G、C、およびU、ならびに/またはT三リン酸塩(2'-OMe ATP、2'-OMe UTPおよび/または2'-OMe TTP、2'-OMe CTP、ならびに2'-OMe GTP)のみを含有する転写混合物は、MNAまたはmRmY混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、MNAアプタマーまたはmRmYアプタマーと称され、2'-オームethylヌクレオチドのみを含

有する。2'-OMe C、および、Uおよび／またはT、ならびに2'-OH AおよびGを含有する転写混合物は、「r R m Y」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r R m Y」アプタマーと称される。デオキシAおよびG、ならびに2'-OMe U、および／またはT、およびCを含有する転写混合物は、「d R m Y」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d R m Y」アプタマーと称される。2'-OMe A、C、およびU、および／またはT、ならびに2'-OH Gを含有する転写混合物は、「r G m H」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r G m H」アプタマーと称される。2'-OMe A、C、Uおよび／またはT、およびG、ならびに2'-OMe A、U、および／またはT、およびC、ならびに2'-F Gを選択的に含有する転写混合物は、「交互混合物」と称され、それから選択されるアプタマーは、「交互混合物」アプタマーと称される。2'-OH AおよびG、ならびに2'-F C、およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「r R f Y」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r R f Y」アプタマーと称される。2'-OMe AおよびG、ならびに2'-F C、およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「m R f Y」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「m R f Y」アプタマーと称される。2'-OMe A、U、および／またはT、およびC、ならびに2'-F Gを含有する転写混合物は、「f G m H」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「f G m H」アプタマーと称される。Gの最大10%がリボヌクレオチドである、2'-OMe A、U、および／またはT、C、およびGを含有する転写混合物は、「r / m G m H」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r / m G m H」アプタマーと称される。2'-OMe A、U、および／またはT、およびC、ならびにデオキシGを含有する転写混合物は、「d G m H」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d G m H」アプタマーと称される。デオキシA、ならびに2'-OMe C、G、およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「d A m B」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d A m B」アプタマーと称される。2'-OH A、ならびに2'-OMe C、G、およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「r A m B」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r A m B」アプタマーと称される。2'-OH Aおよび2'-OH G、ならびに2'-デオキシCおよび2'-デオキシTを含有する転写混合物は、r R d Y混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r R d Y」アプタマーと称される。2'-OMe A、U、および／またはT、およびG、ならびにデオキシCを含有する転写混合物は、「d C m D」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d C m D」アプタマーと称される。2'-OMe A、G、およびC、ならびにデオキシTを含有する転写混合物は、「d T m V」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d T m V」アプタマーと称される。2'-OMe A、C、およびG、ならびに2'-OH Uを含有する転写混合物は、「r U m V」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r U m V」アプタマーと称される。2'-OMe A、C、およびG、ならびに2'-デオキシUを含有する転写混合物は、「d U m V」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d U m V」アプタマーと称される。全ての2'-OHヌクレオチドを含有する転写混合物は、「r N」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「r N」、「r R r Y」、またはRNAアプタマーと称される。全てのデオキシヌクレオチドを含有する転写混合物は、「d N」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「d N」、「d R d Y」、またはDNAアプタマーと称される。2'-F Cならびに2'-OMe A、G、およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「f C m D」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「f C m D」アプタマーと称される。2'-F Uならびに2'-OMe A、G、およびCを含有する転写混合物は、「f U m V」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「f U m V」アプタマーと称される。2'-F AおよびG、ならびに2'-OMe C、およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「f R m Y」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「f R m Y」アプタマーと称される。2'-F Aならびに2'-OMe C、G、

およびU、および／またはTを含有する転写混合物は、「f A m B」混合物と称され、それから選択されるアプタマーは、「f A m B」アプタマーと称される。

【0105】

いくつかの要因を、本明細書に開示のアプタマーを生成するために用いられる転写条件を最適化するのに有用となるよう決定した。例えば、リーダー配列を、DNA転写鑄型の5'末端で固定配列に組み込むことができる。リーダー配列は、典型的には、6～15個のヌクレオチド長、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のヌクレオチド長であり、全てのプリン、またはプリンおよびピリミジンヌクレオチドの混合物から成り得る。

【0106】

2'-OMe GTPを含有する組成物に関して、別の有用な要因は、2'-OHグアノシンまたはグアノシンーリン酸塩(GMP)の存在または濃縮物であり得る。転写を、二段階に分けることができる。第1の段階は、開始であり、その間、RNAが約10～12個のヌクレオチドにより伸長され、第2の段階は、伸長であり、その間、転写が第1の約10～12個のヌクレオチドの添加を越えて進む。過剰な2'-OMe GTPを含有する転写混合物に添加された2'-OH GMPまたはグアノシンが、ポリメラーゼに転写を開始させることを可能にするのに十分であることが見出された。例えば、2'-OHグアノシン、またはGMPでのプライミング転写は、開始ヌクレオチドへのポリメラーゼの特異性のため有用である。GMPの好ましい濃度は、0.5 mM、さらにより好ましくは、1 mMである。

【0107】

転写物への2'-OMe置換ヌクレオチドの組み込みを最適化するのに有用な別の要因は、転写混合物における二価マグネシウムおよびマンガンの両方の使用である。塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの濃度の異なる組み合わせが、2'-O修飾転写物の収率に影響を及ぼし、塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの最適濃度が、二価金属イオンを複合する転写反応混合物中のNTPの濃度によって決まることが見出された。

【0108】

転写反応に含めることができる他の試薬には、N-2-ヒドロキシエチルピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液等の緩衝液、ジチオスレイトール(DTT)等のレドックス試薬、スベルミジン、スベルミン等のポリカチオン、トリトンX100等の界面活性剤、および任意のそれらの組み合わせが含まれる。

【0109】

一実施形態において、HEPES緩衝液の濃度は、0～1 Mに及び得る。本発明は、例えば、トリスヒドロキシメチルアミノメタンを含む、5～10のpKaを有する他の緩衝剤の使用も企図する。いくつかの実施形態において、DTT濃度は、0～400 mMに及び得る。本発明の本方法は、例えば、メルカプトエタノールを含む他の還元剤の使用も提供する。いくつかの実施形態において、スベルミジンおよび／またはスベルミン濃度は、0～20 mMに及び得る。いくつかの実施形態において、PEG-8000の濃度は、0～50% (w/v)に及び得る。本発明の本方法は、例えば、他の分子量のPEGまたは他のポリアルキレングリコールを含む他の親水性ポリマーの使用も提供する。いくつかの実施形態において、トリトンX-100の濃度は、0～0.1% (w/v)に及び得る。本発明の本方法は、他のトリトン-X洗剤を含む、例えば、他の洗剤を含む他の非イオン洗剤の使用も提供する。いくつかの実施形態において、MgCl₂の濃度は、0.5 mM～50 mMに及び得る。MnCl₂濃度は、0.15 mM～1.5 mMに及び得る。いくつかの実施形態において、2'-OMe NTPの濃度(それぞれNTP)は、5 μM～5 mMに及び得る。いくつかの実施形態において、2'-OH GTPの濃度は、0 μM～300 μMに及び得る。いくつかの実施形態において、2'-OH GMPの濃度は、0～5 mMに及び得る。pHは、pH 6～pH 9に及び得る。

【0110】

SEL EXプロセスの変形を用いて、アプタマーを特定することができる。例えば、当業

10

20

30

40

50

者は、アゴニスト S E L E X、トグル S E L E X、2' - 修飾 S E L E X、またはカウンター S E L E Xを用いることができる。S E L E Xプロセスのこれらの変形のそれぞれが当技術分野で既知である。

【0111】

T F P I アプタマー

本発明は、組織因子経路阻害剤 (T F P I) に結合し、いくつかの実施形態において、T F P I の活性を機能的に調節する、例えば、刺激するか、阻止するか、またはさもなければ阻害するか、あるいは刺激する、核酸アプタマー、好ましくは、20 ~ 55 個のヌクレオチド長の核酸アプタマーを含む。

【0112】

T F P I アプタマーは、T F P I もしくは変形または1つ以上のその部分 (もしくは領域) に少なくともある程度結合する。例えば、T F P I アプタマーは、T F P I の直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。T F P I アプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、T F P I の直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。T F P I アプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および/または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、T F P I の等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。

【0113】

本明細書で使用される T F P I 変形は、T F P I 機能と本質的に同一の機能を実行する変形を包含し、好ましくは、実質的に同一の構造を含み、いくつかの実施形態において、ヒト T F P I のアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%の配列同一性、およびより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を含み、配列番号11として図5に示される。

【0114】

好ましくは、T F P I アプタマーは、全長 T F P I に結合する。アプタマーが T F P I の1つ以上の部分に結合する場合、アプタマーが、K3 / C 末端領域等の K1 および K2 領域の外側で、少なくともある程度、T F P I の一部との結合接触または他の相互作用を必要とすることが好ましい。例えば、T F P I アプタマーは、T F P I の直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。T F P I アプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、T F P I の直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。T F P I アプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および/または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、T F P I の等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。より好ましくは、T F P I アプタマーは、アミノ酸 148 ~ 170、アミノ酸 150 ~ 170、アミノ酸 155 ~ 175、アミノ酸 160 ~ 180、アミノ酸 165 ~ 185、アミノ酸 170 ~ 190、アミノ酸 175 ~ 195、アミノ酸 180 ~ 200、アミノ酸 185 ~ 205、アミノ酸 190 ~ 210、アミノ酸 195 ~ 215、アミノ酸 200 ~ 220、アミノ酸 205 ~ 225、アミノ酸 210 ~ 230、アミノ酸 215 ~ 235、アミノ酸 220 ~ 240、アミノ酸 225 ~ 245、アミノ酸 230 ~ 250、アミノ酸 235 ~ 255、アミノ酸 240 ~ 260、アミノ酸 245 ~ 265、アミノ酸 250 ~ 270、アミノ酸 255 ~ 275、アミノ酸 260 ~ 276、アミノ酸 148 ~ 175、アミノ酸 150 ~ 175、アミノ酸 150 ~ 180、アミノ酸 150 ~ 185、アミノ酸 150 ~ 190、アミノ酸 150 ~ 195、アミノ酸 150 ~ 200、アミノ酸 150 ~ 205、アミノ酸 150 ~ 210、アミノ酸 150 ~ 215、

アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される成熟TFPI（例えば、図3A）の1つ以上の部分に少なくともある程度結合する。

【0115】

TFPIは、任意の種由来であり得るが、好ましくは、ヒトである。

10

【0116】

TFPIアプタマーは、好ましくは、100 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形に対する解離定数を含む。いくつかの実施形態において、解離定数を、ドットプロット滴定により決定する。

【0117】

TFPIアプタマーは、リボ核酸、デオキシリボ核酸、修飾された核酸（例えば、2'で修飾）もしくは混合されたりリボ核酸、デオキシリボ核酸および修飾された核酸、または任意のそれらの組み合わせであり得る。アプタマーは、単鎖リボ核酸、デオキシリボ核酸、修飾された核酸（例えば、2'で修飾）、リボ核酸および修飾された核酸、デオキシリボ核酸および修飾された核酸もしくは混合されたりリボ核酸、デオキシリボ核酸および修飾された核酸、または任意のそれらの組み合わせであり得る。

20

【0118】

いくつかの実施形態において、TFPIアプタマーは、少なくとも1つの化学修飾を含む。いくつかの実施形態において、化学修飾は、糖位置での化学的置換、ヌクレオチド間連結での化学的置換、および塩基位置での化学的置換からなる群から選択される。他の実施形態において、化学修飾は、修飾ヌクレオチドの組み込み、3'キャッピング、5'キャッピング、高分子量の非免疫原性化合物との共役、脂溶性化合物との共役、CpGモチーフの組み込み、およびリン酸骨格へのホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートの組み込みからなる群から選択される。好ましい実施形態において、非免疫原性高分子量化合物は、ポリアルキレングリコールであり、より好ましくはポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態において、ポリエチレングリコールは、メトキシポリエチレングリコール（mPEG）である。別の好ましい実施形態において、3'キャッピングは、逆位のデオキシチミジンのキャッピングである。

30

【0119】

本明細書に記載の修飾は、アプタマーの安定性に影響を及ぼす場合もあり、例えば、キャッピング部分の組み込みは、エンドヌクレアーゼ分解に対してアプタマー安定化させ得る。さらに、本明細書に記載の修飾は、その標的へのアプタマーの結合親和性に影響を及ぼす場合もあり、例えば、修飾ヌクレオチドの部位特異的な組み込みまたはPEGとの共役は、結合親和性に影響を及ぼす場合もある。結合親和性へのそのような修飾の影響を、修飾の組み込み前および組み込み後の結合親和性を比較するために、例えば、ELISA等の機能的アッセイ、または微量の標識アプタマーが様々な標的濃度でインキュベートされ、複合体がニトロセルロース上で捕捉されて定量化される結合アッセイ等の多種多様の当技術分野で認識される技術を用いて決定することができる。

40

【0120】

好ましくは、TFPIアプタマーは、TFPIまたは変形もしくは1つ以上のその部分に少なくともある程度結合し、TFPIの機能を阻害するアンタゴニストの役割をする。

【0121】

50

T F P I アプタマーは、完全に、または部分的に、T F P I によって媒介される血液凝固の阻害を阻害するか、減少させるか、阻止するか、またはさもなければ調節する。T F P I アプタマーの存在下でT F P I によって媒介される阻害のレベルが、T F P I アプタマーの不在下でT F P I によって媒介される阻害のレベルと比較して、少なくとも95%、例えば、96%、97%、98%、99%、または100%減少する時に、T F P I アプタマーは、T F P I によって媒介される血液凝固の阻害等、T F P I 生物学的活性を完全に調節するか、阻止するか、阻害するか、減少させるか、拮抗するか、中和させるか、またはさもなければ妨害すると考えられる。T F P I アプタマーの不在下でT F P I によって媒介される阻害のレベルが、T F P I アプタマーの不在下でT F P I 活性のレベルと比較して、95%未満、例えば、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、または90%減少する時、T F P I アプタマーは、T F P I によって媒介される阻害等、T F P I 生物学的活性を部分的に調節するか、阻止するか、阻害するか、減少させるか、拮抗するか、中和するか、またはさもなければ妨害すると考えられる。

10

【0122】

治療薬および／または診断薬としての使用のためのT F P I に結合し、その機能を調節するアプタマーの例として、A R C 2 6 8 3 5、A R C 1 7 4 8 0、A R C 1 9 4 9 8、A R C 1 9 4 9 9、A R C 1 9 5 0 0、A R C 1 9 5 0 1、A R C 3 1 3 0 1、A R C 1 8 5 4 6、A R C 1 9 8 8 1、およびA R C 1 9 8 8 2が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0123】

好ましくは、T F P I アプタマーは、以下の核酸配列のうちの1つを含む：

(A R C 2 6 8 3 5)

「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は、(当技術分野において2'-OMe、2'-メトキシ、または2'-OCH₃含有ヌクレオチドとしても既知の) 2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、m G-m G-m A-m A-m U-m A-m U-m A-d C-m U-m U-m G-m G-d C-m U-d C-m G-m U-m U-m A-m G-m G-m U-m G-d C-m G-m U-m A-m U-m A-m U-m A (配列番号1)

、

(A R C 1 7 4 8 0)

30

「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、m G-m G-m A-m A-m U-m A-m U-m A-d C-m U-m U-m G-m G-d C-m U-d C-m G-m U-m U-m A-m G-m G-m U-m G-d C-m G-m U-m A-m U-m A-m U-m A-3 T (配列番号2)、

(A R C 1 9 4 9 8)

「NH₂」は5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、NH₂-m G-m G-m A-m A-m U-m A-m U-m A-d C-m U-m U-m G-m G-d C-m U-d C-m G-m U-m U-m A-m G-m G-m U-m G-d C-m G-m U-m A-m U-m A-m U-m A-3 T (配列番号3)、

40

(A R C 1 9 4 9 9)

「NH」は5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「P E G」はポリエチレングリコールである、P E G 4 0 K-NH-m G-m G-m A-m A-m U-m A-m U-m A-d C-m U-m U-m G-m G-d C-m U-d C-m G-m U-m U-m A-m G-m G-m U-m G-d C-m G-m U-m A-m U-m A-m U-m A-3 T (配列番号4)、

(A R C 1 9 5 0 0)

50

「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「NH₂」はヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来である、NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-NH₂（配列番号5）、
(AR C 1 9 5 0 1)

「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「NH」はヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「PEG」はポリエチレングリコールである、PEG 20 K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-NH-PEG 20 K（配列番号6）、
(AR C 3 1 3 0 1)

「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA（配列番号7）、
(AR C 1 8 5 4 6)

「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3 T（配列番号8）、
(AR C 1 9 8 8 1)

「NH₂」は5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである、NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3 T（配列番号9）、
(AR C 1 9 8 8 2)

「NH」は5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドであり、「PEG」はポリエチレングリコールである、PEG 40 K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3 T（配列番号10）。

【0124】

AR C 2 6 8 3 5の化学名は、2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-OMe-アデニルル（3'→5'）-2'-OMe-アデニルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-OMe-アデニルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-OMe-アデニルル（3'→5'）-2'-デオキシシチジルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-デオキシシチジルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-デオキシシチジルル（3'→5'）-2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-OMe-ウラシルル（3'→5'）-2'-OMe-アデニルル（3'→5'）-2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-OMe-グアニルル（3'→5'）-2'-O

10

20

30

40

50

Me-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-
 -デオキシシチジリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-
 2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5'
)-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→
 5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリルである
 。

【0125】

ARC17480の化学名は、2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-
 グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-
 アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-
 アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-
 OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-デオキシシチジリル-(3'→5'
)-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'
 →5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(
 3'→5')-2'-デオキシシチジリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル
 -(3'→5')-2'-デオキシシチジリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニ
 リル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-ウ
 ラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-OMe
 -グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-O
 Me-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-
 -デオキシシチジリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-
 2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5'
)-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→
 5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'
 →5')-(3'→3')-2'-デオキシチミジンである。

10

20

【0126】

ARC19498の化学名は、6-アミノヘキシリル-(1→5')-2'-OMe-グ
 アニリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe
 -アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-O
 Me-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-
 OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-
 2'-デオキシシチジリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5'
)-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→
 5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-デオキシシチジリル-(3'
 →5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-デオキシシチジリル
 -(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリ
 ル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe-アデ
 ニリル-(3'→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-
 グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe
 -グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-OMe
 -グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-
 OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'
 -OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5'
)-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5'
)-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-(3'→3')-2'-デオキシチ
 ミジンである。

30

40

【0127】

ARC19499の化学名は、N-(メトキシ-ポリエチレングリコール)-6-アミノ
 ヘキシリル-(1→5')-2'-OMe-グアニリル-(3'→5')-2'-OMe
 -グアニリル-(3'→5')-2'-OMe-アデニリル-(3'→5')-2'-O
 Me-アデニリル-(3'→5')-2'-OMe-ウラシリル-(3'→5')-2'-

50

-OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') -
 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5'
) - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' →
 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3'
 ' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル-
 (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル-
 (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラ
 シル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-
 グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OM
 e-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' -
 デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2
 ' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5')
 - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5
 ') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3'
 → 5') - (3' → 3') - 2' - デオキシチジンである。

10

【0128】

ARC19500の化学名は、6-アミノヘキシル- (1 → 5') - 2' - OMe-グ
 アニル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe
 -アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - O
 Me-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2'
 - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') -
 2' - デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5'
) - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' →
 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3
 ' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル-
 (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシリ
 ル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデ
 ニル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-
 グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OM
 e-グアニル- (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5') - 2'
 OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2
 ' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5')
 - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5
 ') - 2' - OMe-アデニル- 6-アミノヘキシルである。

20

30

【0129】

ARC19501の化学名は、N-(メトキシポリエチレングリコール)-6-アミノ
 ヘキシル- (1 → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe
 -グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - O
 Me-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2'
 - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') -
 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5'
) - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' →
 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3
 ' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル-
 (3' → 5') - 2' - デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル
 ル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-ウラ
 シル- (3' → 5') - 2' - OMe-アデニル- (3' → 5') - 2' - OMe-
 グアニル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' - OM
 e-ウラシル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2' -
 デオキシチジリル- (3' → 5') - 2' - OMe-グアニル- (3' → 5') - 2

40

50

’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- 6-アミノヘキシル-N- (メトキシ-ポリエチレングリコール) である。

【0130】

ARC 31301 の化学名は、2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-デオキシチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-シチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-デオキシチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-シチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニルである。

10

20

【0131】

ARC 18546 の化学名は、2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-デオキシチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-シチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-デオキシチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-シチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - (3’→3’) - 2’-デオキシチミジンである。

30

40

【0132】

ARC 19881 の化学名は、6-アミノヘキシル- (1→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-アデニル- (3’→5’) - 2’-デオキシチジリル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-ウラシル- (3’→5’) - 2’-OMe-グアニル- (3’→5’)

50

5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - シチジリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - シチジリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - (3' → 3') - 2' - デオキシチミジンである。

10

【0133】

ARC19882の化学名は、N - (メトキシ - ポリエチレングリコール) - 6 - アミノヘキシリル - (1 → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - デオキシシチジリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - シチジリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - デオキシシチジリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - シチジリル - (3' → 5') - 2' - OMe - グアニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - 2' - OMe - ウラシリル - (3' → 5') - 2' - OMe - アデニリル - (3' → 5') - (3' → 3') - 2' - デオキシチミジンである。

20

30

【0134】

本発明のTFPIアダプターは、任意の二次構造を有し得る。好ましくは、TFPIアダプターは、図10Aおよび図10B等のステムおよびループモチーフを含む。ARC19499の推定上の二次構造が図10Cに示され、ステムおよびループモチーフを含む。

【0135】

好ましくは、TFPIアダプターは、1つ以上のリンカーを伴って(図10B)、または伴わずに(図10A)、1つ以上のPEG部分に結合される。PEG部分は、任意の型のPEG部分であり得る。例えば、PEG部分は、線形、分岐、多分岐、星形、楕形、または樹枝状であり得る。加えて、PEG部分は、任意の分子量を有し得る。好ましくは、PEG部分は、5~100kDaの範囲の大きさの分子量を有する。より好ましくは、PEG部分は、10~80kDaの範囲の大きさの分子量を有する。さらにより好ましくは、PEG部分は、20~60kDaの範囲の大きさの分子量を有する。なお一層より好ましくは、PEG部分は、30~50kDaの範囲の大きさの分子量を有する。最も好ましくは、PEG部分は、40kDaの大きさの分子量を有する。同一または異なるPEG部分を、TFPIアダプターに結合することができる。同一または異なるリンカーを用いて、同一または異なるPEG部分をTFPIアダプターに結合させてもよく、あるいはリンカーを用いなくてもよい。

40

【0136】

50

あるいは、TFPIアプタマーを、1つ以上のリンカーの有無にかかわらず、(1つ以上のPEG部分に結合するというよりはむしろ)1つ以上のPEG代替物に結合することができる。PEG代替物の例として、ポリオキサゾリン(POZ)、PolyPEG、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、およびアルブミンが挙げられるが、それらに限定されない。PEG代替物は、任意の型のPEG代替物であってもよいが、PEG部分と同一または同様に機能する、すなわち、腎臓濾過を軽減し、循環血液中のTFPIアプタマーの半減期を増加させるはずである。同一または異なるPEG代替物を、TFPIアプタマーに結合することができる。同一または異なるリンカーを用いて、同一または異なるPEG代替物をTFPIアプタマーに結合させてもよく、あるいはリンカーを用いなくてもよい。あるいは、PEG部分およびPEG代替物の組み合わせを、同一または異なるリンカーのうちの1つ以上の有無にかかわらず、TFPIアプタマーに結合することができる。

10

【0137】

好ましくは、TFPIアプタマーは、リンカーを介してPEG部分に結合される(図10B)。しかしながら、リンカーを使用することなく、TFPIアプタマーを、PEG部分に直接結合することができる(図10A)。リンカーは、任意の種類の分子であり得る。リンカーの例として、アミン、チオール、およびアジドが挙げられるが、それらに限定されない。例えば、アミン(RNH_2)および活性化エステル($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{OR}''$)または無水物($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{OC}(=\text{O})\text{R}''$)をリンカーとして用いて、アミド($\text{R}'(\text{C}=\text{O})\text{NR}$)を産出することができる。活性化エステルは、制限なく、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)およびNHSのスルホン誘導体、ニトロフェニルエステル、および他の置換芳香族誘導体を含む。無水物は、コハク酸無水物誘導体等の環状であり得る。アミン(RNH_2)および活性化炭酸塩($\text{R}'\text{OC}(=\text{O})\text{OR}''$)を用いて、カルバミン酸塩($\text{ROC}(=\text{O})\text{NR}$)を産出することができる。活性化カルバミン酸塩は、制限なく、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)およびNHSのスルホン誘導体、ニトロフェニルカルバメートを含む。アミン(RNH_2)およびイソチオシアネート($\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{S}$)をリンカーとして用いて、イソチオ尿素($\text{RNHC}(=\text{S})\text{NHR}'$)を産出することができる。アミン(RNH_2)およびイソシアネート($\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{O}$)をリンカーとして用いて、イソ尿素($\text{RNH}(\text{C}=\text{O})\text{NHR}'$)を産出することができる。アミン(RNH_2)およびアシルアジド($\text{R}'(\text{C}=\text{O})\text{N}_2$)をリンカーとして用いて、アミド($\text{RNH}(\text{C}=\text{O})\text{R}'$)を産出することができる。アミン(RNH_2)およびアルデヒドまたはグリオキサル($\text{R}'(\text{C}=\text{O})\text{H}$)をリンカーとして用いて、イミン($\text{R}'\text{CH}=\text{NR}$)または還元を介したアミン($\text{R}'\text{CH}_2=\text{NHR}$)を産出することができる。アミン(RNH_2)およびスルホニルクロリド($\text{R}'\text{SO}_2\text{Cl}$)をリンカーとして用いて、スルホンアミド($\text{R}'\text{SO}_2\text{NHR}$)を産出することができる。アミン(RNH_2)およびエポキシドおよびオキシランをリンカーとして用いて、 α -ヒドロキシアミンを得ることができる。チオール(RSH)およびヨードアセチル($\text{R}'(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$)をリンカーとして用いて、チオエーテル($\text{RSCCH}_2(\text{O}=\text{C})\text{R}'$)を産出することができる。チオール(RSH)およびマレイミドまたはマレイミド誘導体をリンカーとして用いて、チオエーテルを得ることができる。チオール(RSH)およびアジリジンをリンカーとして用いて、 α -アミンチオエーテルを得ることができる。チオール(RSH)およびアクリロイル誘導体($\text{R}'\text{CH}=\text{CH}_2$)をリンカーとして用いて、チオエーテル($\text{R}'\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SR}$)を得ることができる。チオール(RSH)およびジスルフィド($\text{R}'\text{SSR}''$)をリンカーとして用いて、ジスルフィド(RSSR' または R'')を得ることができる。チオール(RSH)およびビニルスルホン($\text{CH}_2=\text{CHSO}_2\text{R}'$)をリンカーとして用いて、チオールエーテル($\text{RSCCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}'$)を産出することができる。アジド(RN_3)およびアルキン($\text{R}'\text{C}\equiv\text{H}$)をリンカーとして用いて、トリアゾリンを産出することができる。好ましくは、リンカーは、リン酸基を含有する。好ましくは、リンカーは、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来である。いくつかの実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2~18個の連続した CH_2 基を含む。より好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホス

20

30

40

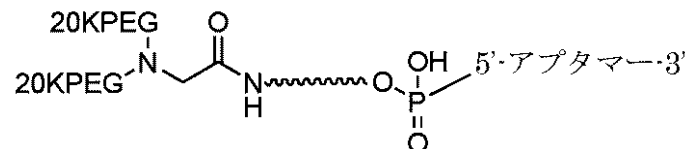
50

ホルアミダイトは、2～12個の連続したCH₂基を含む。さらにより好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、4～8個の連続したCH₂基を含む。最も好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、6個の連続したCH₂基を含み、すなわち、5'-ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイトである。同一もしくは異なるリンカーのうちの1つ以上を用いて、同一もしくは異なるPEG部分のうちの1つ以上または同一もしくは異なるPEG代替物のうちの1つ以上をTFPIアプタマーに結合させてもよく、あるいはリンカーを用いなくてもよい。

【0138】

好ましい実施形態において、以下の構造：

【化7】



を含むアプタマーまたはその塩が提供され、
式中、

【化7-2】

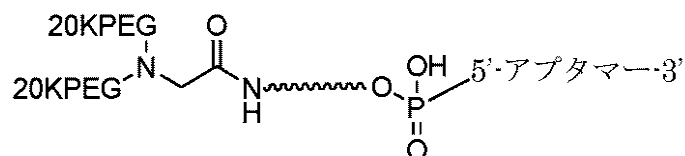


は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

【0139】

特定の実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化8】



を含み、式中、

【化8-2】



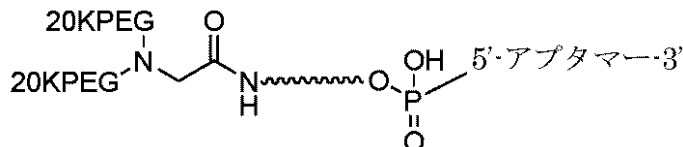
は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、
アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号2）の核酸配列を有し、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2～18個の連続したCH₂基を含む。より好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2～12個の連続したCH₂基を含む。さらにより好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、4～8個の連続したCH₂基を含む。最も好ましい実施形態

において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、6個の連続したCH₂基を含む。
20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。
好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

【0140】

特定の実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化9】



10

を含み、式中、

【化9-2】



は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、

アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-
mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-m
C-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号8）の核酸配列を有し、
「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、
「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、
5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2～18個の連続したCH₂基を含む。
より好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2～12
個の連続したCH₂基を含む。さらにより好ましい実施形態において、5'-アミンリン
カーホスホルアミダイトは、4～8個の連続したCH₂基を含む。最も好ましい実施形態
において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、6個の連続したCH₂基を含む。
20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。
好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

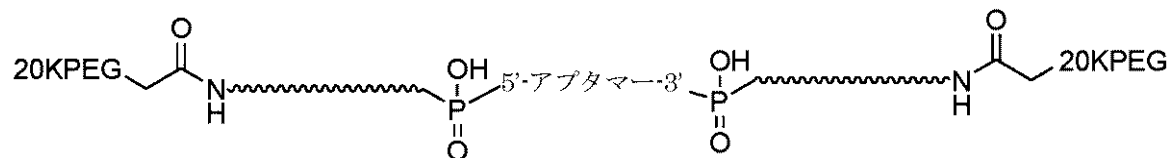
20

30

【0141】

好ましい代替実施形態において、以下の構造：

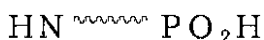
【化10】



40

を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、

【化10-2】



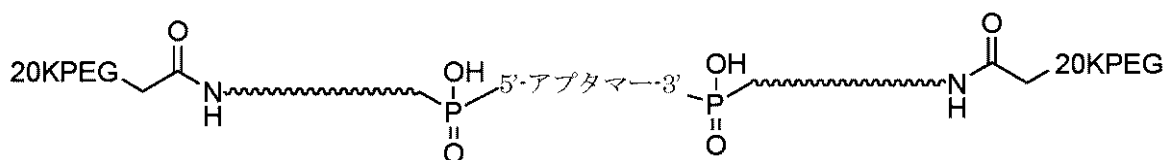
は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。20KPEG部分は、20kDaの分子量を有する任意のPEG部分であってもよい。好ましくは、20KPEG部分は、20kDaの分子量を有するmPEG部分である。

【0142】

50

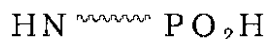
特定の代替実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化 1 1】



を含み、式中、

【化 1 1 - 2】



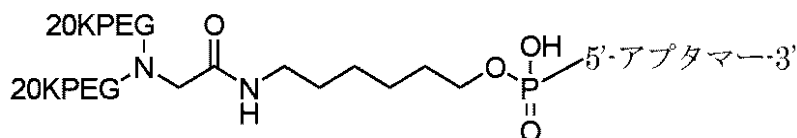
は、5'-アミンリンカーホスホルアミダイト由来であり、

アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA（配列番号 1）の核酸配列を有し、dN「はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2～18 個の連続した CH₂ 基を含む。より好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、2～12 個の連続した CH₂ 基を含む。さらにより好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、4～8 個の連続した CH₂ 基を含む。最も好ましい実施形態において、5'-アミンリンカーホスホルアミダイトは、6 個の連続した CH₂ 基を含む。20KPEG 部分は、20 kDa の分子量を有する任意の PEG 部分であってもよい。好ましくは、20KPEG 部分は、20 kDa の分子量を有する mPEG 部分である。

【0 1 4 3】

より好ましい実施形態において、以下の構造：

【化 1 2】

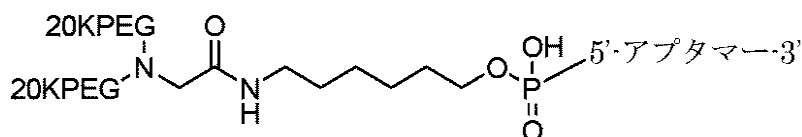


を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、アプタマーは、本発明の TFPI アプタマーである。20KPEG 部分は、20 kDa の分子量を有する任意の PEG 部分であってもよい。好ましくは、20KPEG 部分は、20 kDa の分子量を有する mPEG 部分である。

【0 1 4 4】

特定の実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化 1 3】



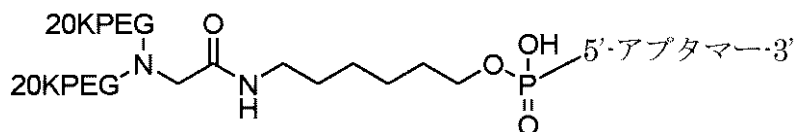
を含み、式中、アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号 2）の

核酸配列を有し、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有する任意のP E G部分であってもよい。好ましくは、20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有するm P E G部分である。

【0145】

特定の実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化14】



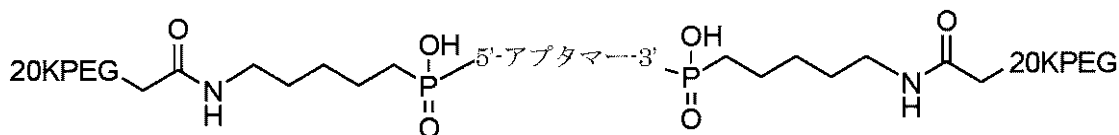
10

を含み、式中、アプタマーは、m G - m G - m A - m A - m U - m A - m U - m A - d C - m U - m U - m G - m G - m C - m U - d C - m G - m U - m U - m A - m G - m G - m U - m G - m C - m G - m U - m A - m U - m A - m U - m A - 3 T（配列番号8）の核酸配列を有し、「3 T」は逆位のデオキシチミジンであり、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有する任意のP E G部分であってもよい。好ましくは、20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有するm P E G部分である。

【0146】

より好ましい代替実施形態において、以下の構造：

【化15】



20

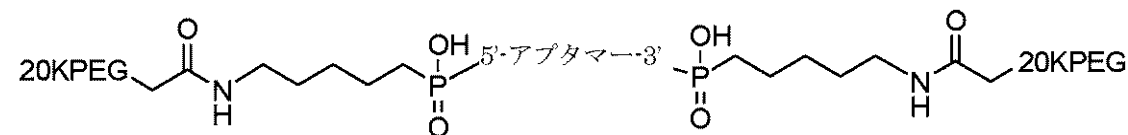
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、アプタマーは、本発明のT F P I アプタマーである。20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有する任意のP E G部分であってもよい。好ましくは、20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有するm P E G部分である。

30

【0147】

特定の代替実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化16】



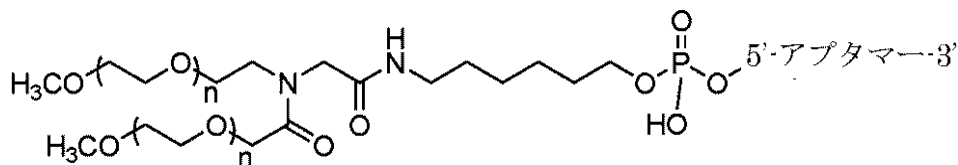
を含み、式中、アプタマーは、m G - m G - m A - m A - m U - m A - m U - m A - d C - m U - m U - m G - m G - d C - m U - d C - m G - m U - m U - m A - m G - m G - m U - m G - d C - m G - m U - m A - m U - m A - m U - m A（配列番号1）の核酸配列を有し、「d N」はデオキシヌクレオチドであり、「m N」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有する任意のP E G部分であってもよい。好ましくは、20 K P E G部分は、20 k D aの分子量を有するm P E G部分である。

40

【0148】

最も好ましい実施形態において、以下の構造：

【化 17】



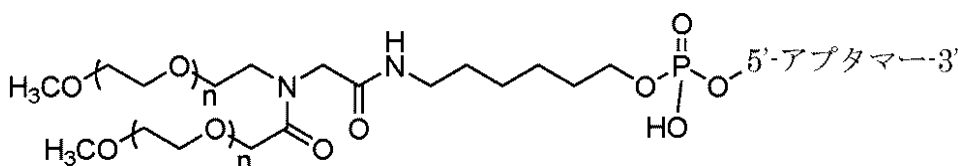
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、「n」は、約 454 個のエチレンオキシド単位（PEG = 20 kDa）であり、アプタマーは、本発明の TFPI アプタマーである。n の数が特定の分子量を有する PEG に対してわずかに異なり得るため、「n」は、約 454 個のエチレンオキシド単位である。好ましくは、「n」は、400～500 個のエチレンオキシド単位に及ぶ。より好ましくは、「n」は、425～475 個のエチレンオキシド単位に及ぶ。さらにより好ましくは、「n」は、440～460 個のエチレンオキシド単位に及ぶ。最も好ましくは、「n」は、454 個のエチレンオキシド単位である。

10

【0149】

特定の実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化 18】



20

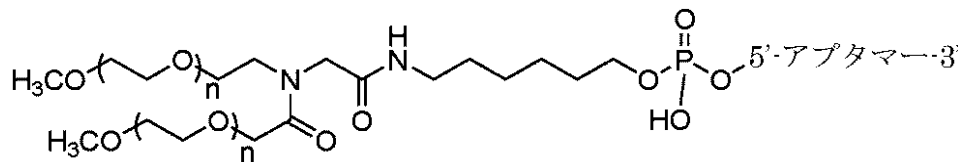
を含み、式中、アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号 2）の核酸配列を有し、「n」は約 450 であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。本アプタマーは、ARC19499 としても既知である。

30

【0150】

特定の実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化 19】



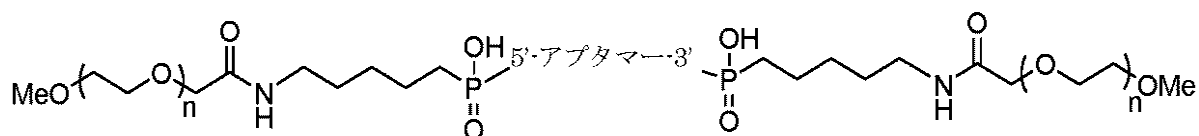
40

を含み、式中、アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T（配列番号 8）の核酸配列を有し、「n」は約 450 であり、「3T」は逆位のデオキシチミジンであり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は 2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。本アプタマーは、ARC19882 としても既知である。

【0151】

最も好ましい代替実施形態において、以下の構造：

【化 20】



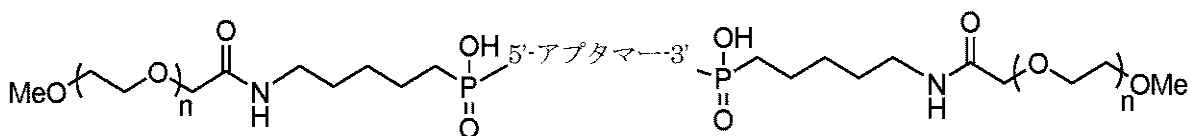
を含むアプタマーまたはその塩が提供され、式中、「n」は、約454個のエチレンオキシド単位（PEG＝20kDa）であり、アプタマーは、本発明のTFPIアプタマーである。nの数が、特定の分子量を有するPEGに対してわずかに異なり得るため、「n」は、約454個のエチレンオキシド単位である。好ましくは、「n」は、400～500個のエチレンオキシド単位に及ぶ。より好ましくは、「n」は、425～475個のエチレンオキシド単位に及ぶ。さらにより好ましくは、「n」は、440～460個のエチレンオキシド単位に及ぶ。最も好ましくは、「n」は、454個のエチレンオキシド単位である。

10

【0152】

特定の代替実施形態において、アプタマーまたはその塩は、以下の構造：

【化 21】



20

を含み、式中、アプタマーは、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA（配列番号1）の核酸配列を有し、「n」は約450であり、「dN」はデオキシヌクレオチドであり、「mN」は2'-Oメチルを含有するヌクレオチドである。本アプタマーは、ARC19501としても既知である。

【0153】

本発明は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIに結合する能力を有するアプタマーも提供する。いくつかの実施形態において、アプタマーは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一の構造を有する。いくつかの実施形態において、アプタマーは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIおよび実質的に同一の構造に結合する能力を有する。本発明は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIに結合する能力および実質的に同一のTFPIの生物学的機能を調節する能力を有するアプタマーも提供する。本発明はさらに、アプタマーを提供する。配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIに結合する能力および実質的に同一の血液凝固を調節する能力を有する。本発明は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIの生物学的機能を調節する能力を有するアプタマーも提供する。本発明は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一の構造および実質的に同一の血液凝固を調節する能力を有するアプタマーも提供する。いくつかの実施形態において、アプタマーは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIに結合する能力、実質的に同一の構造、および実質的に同一のTFPIの生物学的機能を調節する能力を有する。いくつかの実施形

30

40

50

態において、アプタマーは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示されるアプタマーのうちのいずれか1つと実質的に同一のTFPIに結合する能力、実質的に同一の構造、および実質的に同一の血液凝固を調節する能力を有する。本明細書で使用される、実質的に同一のTFPIに結合する能力とは、親和性が、本明細書に記載の核酸配列および／またはアプタマーの親和性の10倍または100倍以内であることを意味する。所与の配列が実質的に同一のTFPIに結合する能力を有するかを決定することは、十分に当業者の技術の範囲内である。いくつかの実施形態において、TFPIに結合するアプタマーは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10と少なくとも70%、80%、90%、または95%同一である核酸配列を有する。

【0154】

TFPIに結合するアプタマーの能力を、実施例34で説明されるように、結合競合アッセイで評価することができ、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示される本アプタマーのうちの1つを、対照アプタマーの役割をする競合相手として選択することができる。例えば、好適なアッセイは、微量の放射標識した対照アプタマーおよび5000nM、16667nM、556nM、185nM、61.7nM、20.6nM、6.86nM、2.29nM、0.76nM、または0.25nMの非標識競合アプタマーを有する10nMヒトTFPI (American Diagnostica, Stamford, CT、カタログ番号4500PC)をインキュベートすることを含み得る。対照アプタマーを各実験に含める。各分子に関して、それぞれの競合アプタマーの濃度で結合される放射標識した対照アプタマーの割合を分析に用いた。結合される放射標識した対照アプタマーの割合を、アプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\max / (1 + x / IC_{50})) + \text{int}$ (式中、 y = 結合される放射標識した対照アプタマーの割合、 x = アプタマーの濃度、 $\max$ = 結合される最大の放射標識した対照アプタマー、および $\text{int} = y$ 切片)に当てはめ、結合競合についての IC_{50} 値を生成する。各アプタマーの IC_{50} を、同一の実験で評価される対照アプタマーの IC_{50} と比較する。実質的に同一の結合する能力を有するアプタマーは、対照アプタマーの IC_{50} の10倍または100倍以内である IC_{50} を有するアプタマーおよび／または同一の実験で評価される対照アプタマーの IC_{50} よりも最大で5倍大きい IC_{50} を有するアプタマーを含み得る。

【0155】

生物学的機能を調節および／または血液凝固を調節するアプタマーの能力を、例えば、実施例34で説明されるように、自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイで評価することができ、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示される本アプタマーのうちの1つを対照アプタマーとして選択することができる。例えば、好適なアッセイは、500nM、167nM、55.6nM、18.5nM、6.17nM、および2.08nMアプタマー濃度でプールされた血友病A血漿におけるCATアッセイでの評価を含み得る。対照アプタマーを各実験に含める。各分子に関して、各アプタマー濃度の内因性トロンビン生成能(ETP)およびピークトロンビン値を分析に使用する。血友病A血漿のみのETPまたはピークトロンビン値を、各濃度での各分子について、アプタマーの存在下での対応する値から減算する。次いで、補正したETPおよびピーク値を、アプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\max / (1 + IC_{50} / x)) + \text{int}$ (式中、 y = ETPまたはピークトロンビン、 x = アプタマーの濃度、 $\max$ = 最大ETPまたはピークトロンビン、ならびに $\text{int} = y$ 切片)に当てはめ、ETPおよびピークトロンビン双方についての IC_{50} 値を生成する。各アプタマーの IC_{50} を、同一の実験で評価される対照アプタマーの IC_{50} と比較する。実質的に同一の生物学的機能を調節および／または血液凝固を調節する能力を有するアプタマーは、対照アプタマーの IC_{50} の10倍または100倍以内である IC_{50} を有するアプタマー、および／またはその分子のETPおよびピークトロンビン IC_{50} のうちの1つまたは両方が同一の実験で評価される対照アプタマーの IC_{50} よりも最大5倍大きいアプタマーを含み得る。

【0156】

生物学的機能を調節および／または血液凝固を調節するアプタマーの能力を、例えば、実施例34で説明されるように、第Xa因子(FXa)活性アッセイにおいてTFPIの阻害を評価することにより評価することができ、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10に示される本アプタマーのうちの1つを、対照アプタマーとして選択することができる。好適なアッセイは、場合によってはアプタマーを添加して、TFPIの存在下および不在下で発色性基質を切断するFXaの能力を測定することを含み得る。例えば、2nMヒトFXaを、8nMヒトTFPIとともにインキュベートする。次いで、500μM発色性基質およびアプタマーを添加し、基質のFXa切断を、時間の関数として、405nm(A_{405})での吸光度により測定する。アプタマーを、500nM、125nM、31.25nM、7.81nM、1.95nM、および0.49nM濃度で試験する。対照アプタマーを各実験に含める。各アプタマー濃度に関して、 A_{405} を、時間の関数としてプロットし、各曲線の直線領域を、等式 $y = mx + b$ (式中、 $y = A_{405}$ 、 $x =$ アプタマー濃度、 $m =$ 基質切断速度、および $b = y$ 切片)に当てはめ、FXa基質切断速度を生成する。TFPIの存在下、およびアプタマーの不在下でのFXa基質切断速度を、各濃度での各分子について、TFPIおよびアプタマー双方の存在下での対応する値から減算する。次いで、補正した速度を、アプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (V_{max} / (1 + IC_{50} / x))$ (式中、 $y =$ 基質切断速度、 $x =$ アプタマーの濃度、ならびに $V_{max} =$ 基質切断の最大速度)に当てはめ、 IC_{50} および最大(V_{max})値を生成する。各アプタマーの IC_{50} および V_{max} 値を、同一の実験で評価される対照アプタマーの IC_{50} および V_{max} 値と比較する。実質的に同一の生物学的機能を調節および／または血液凝固を調節する能力を有するアプタマーは、対照アプタマーの IC_{50} の10倍または100倍以内である IC_{50} を有するアプタマー、および／または同一の実験で評価される対照アプタマーの IC_{50} よりも最大5倍大きい IC_{50} を有するアプタマー、および／または同一の実験で評価される対照アプタマーの V_{max} 値の少なくとも80%の V_{max} 値を有するアプタマーを含み得る。

【0157】

2つ以上の核酸またはタンパク質配列の文脈において、「配列同一性」もしくは「%同一性」という用語は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを用いて、または目視検査により測定される時、最大一致について比較およびアライメントした場合に、同一であるか、あるいは同一である特定の割合のアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つ以上の配列もしくは部分列を指す。配列比較に関して、典型的には、1つの配列は、試験配列と比較される参照配列の役割をする。比較のための配列の最適アライメントを、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似法の検索により、コンピュータによるこれらのアルゴリズムの実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)により、または目視検査(概して、Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)を参照のこと)により行うことができる。

【0158】

配列同一性の割合を決定するのに好適なアルゴリズムの一例は、基本的局所アライメント検索ツール(以下「BLAST」)で用いられるアルゴリズムであり、例えば、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)およびAltschul et al., Nucleic Acids Res., 15:3389-3402 (1997)を参照されたく、National Center

for Biotechnology Information (以下「NCBI」) から公的に入手可能である。

【0159】

SELEX (商標) 法、2' 修飾 SELEX (商標) により特定されるアプタマー、最小化アプタマー、最適化アプタマー、および化学的に置換されたアプタマーアプタマーを含むが、それらに限定されない本発明のアプタマーを、固相オリゴヌクレオチド合成技術等の当技術分野で周知の任意のオリゴヌクレオチド合成技術を用いて製造することができる (例えば、Gualtiere, F. Ed., New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry, Ch 9, Chemistry of Antisense Oligonucleotides, p. 261-335, 2000, Wiley-VCH, New York を参照のこと)。固相オリゴヌクレオチド合成技術を用いたアプタマーの製造を、工業規模で行うこともできる。トリエステル合成法 (例えば、Sood et al., Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) および Hirose et al., Tet. Lett., 28: 2449 (1978) を参照のこと) 等の液相法ならびに組換え手段を用いて、本発明のアプタマーを製造することもできる。

【0160】

加えて、多種多様の官能基を、固相合成中に導入することができる。官能性は、アミンまたはチオール等の官能基をもたらし単純なリンカーであってもよく、あるいはジオチンまたは蛍光色素等のより複雑な構築物であってもよい。典型的には、官能基リンカーまたはより複雑な部分を、ホスホルアミダイトを用いて導入するか、あるいは合成後 (すなわち、固相合成後) に導入することができる。あるいは、修飾された固体支持体を利用することにより、多種多様の官能性を、オリゴヌクレオチドの 3' 末端で導入することができ、それにより、より多岐にわたる共役技術を可能にする。

【0161】

本発明はさらに、SELEX (商標) プロセスにより同定されたアプタマーを提供し、(a) 結合が起こる条件下で、核酸の混合物を TFPI と接触させるステップ、(b) 未結合核酸を TFPI に結合した核酸から分配するステップ、(c) 結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(d) 所望する回数の周期で、結合、分配、および増幅するステップを繰り返して、TFPI に結合するアプタマーを得るステップを含む。

【0162】

本発明はさらに、TFPI の 1 つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを同定するための方法を提供し、(a) 結合が起こる条件下で、核酸の混合物を TFPI の 1 つ以上の部分と接触させるステップ、(b) 未結合核酸を TFPI に結合した核酸から分配するステップ、(c) 結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(d) 所望する回数の周期で、接触、分配、および増幅するステップを繰り返して、TFPI に結合するアプタマーを得るステップを含む。本方法は、全長 TFPI に結合し、続いて、分配および増幅する、介在する周期または追加の周期を含み得る。例えば、TFPI アプタマーは、TFPI の直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用し得る。TFPI アプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPI の直線部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。TFPI アプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および/または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPI の等角部分に結合するか、あるいはさもなければそれと相互作用する。好ましくは、成熟 TFPI の 1 つ以上の部分 (例えば、図 3A) は、アミノ酸 148~170、アミノ酸 150~170、アミノ酸 155~175、アミノ酸 160~180、アミノ酸 165~185、

アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

【0163】

本発明は、TFPIの1つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなくばそれと相互作用するアプタマーを同定するための方法も提供し、(a)結合が起こる条件下で、核酸の混合物を全長TFPIもしくはTFPIの1つ以上の部分と接触させるステップ、(b)未結合核酸を全長TFPIもしくはTFPIの1つ以上の部分に結合した核酸から分配するステップ、(c)全長TFPIもしくはTFPIの一部に結合するリガンドを有する結合された核酸、または全長TFPIもしくはTFPIの一部に結合するリガンドを特異的に溶出するステップ、(d)結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(e)所望する回数の周期で、接触、分配、溶出、および増幅するステップを繰り返して、TFPIの1つ以上の部分に結合するアプタマーを得るステップを含む。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。好ましくは、成熟TFPIの1つ以上の部分(例えば、図3A)は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～22

5、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

【0164】

本発明は、TFPIの1つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなくばそれと相互作用するアプタマーを同定するための方法も提供し、(a) TFPI上の1つ以上のエピトープがアプタマー結合するのを阻止するTFPIリガンド(TFPIに結合するリガンド)の存在下で結合が起こる条件下で、核酸の混合物を全長TFPIまたはTFPIの1つ以上の部分と接触させるステップ、(b) 未結合核酸を全長TFPIまたはTFPIの1つ以上の部分に結合した核酸から分配するステップ、(c) 結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(d) 所望の回数の周期で、接触、分配、および増幅するステップを繰り返して、TFPIの1つ以上の部分に結合するアプタマーを得るステップを含む。本方法の他の実施形態において、TFPI上の1つ以上の部分がアプタマー結合するのを阻止するTFPIリガンドの包括は、接触ステップ、分配ステップ、または両方のステップ中に起こり得る。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および/または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。好ましくは、成熟TFPIの1つ以上の部分(例えば、図3A)は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、好

ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

【0165】

本発明は、TFPIの1つ以上の部分に少なくともある程度結合するか、またはさもなくばそれと相互作用するアプタマーを同定するための方法も提供し、(a)結合が起こる条件下で、核酸の混合物を全長TFPIまたはTFPIの1つ以上の部分と接触させるステップ、(b)所望の機能的性質を有する結合された核酸を、所望の機能的性質を有さない結合された核酸から分配するステップ、(c)TFPIの部分に結合された核酸、または全長TFPIもしくはTFPIの部分に結合するリガンドを特異的に溶出するステップ、(d)所望の機能的性質を有する結合された核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮混合物を産出するステップ、ならびに任意で、(e)所望の回数の周期で、接触、分配、分配、および増幅するステップを繰り返して、TFPIの1つ以上の部分に結合するアプタマーを得るステップを含む。ステップ(b)およびステップ(c)は、連続して、または同時に起こり得る。例えば、TFPIアプタマーは、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用し得る。TFPIアプタマーが、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。TFPIアプタマーが、ポリペプチド鎖の二次および/または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する時に、そのアプタマーは、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもなくばそれと相互作用する。好ましくは、成熟TFPIの1つ以上の部分(例えば、図3A)は、アミノ酸148~170、アミノ酸150~170、アミノ酸155~175、アミノ酸160~180、アミノ酸165~185、アミノ酸170~190、アミノ酸175~195、アミノ酸180~200、アミノ酸185~205、アミノ酸190~210、アミノ酸195~215、アミノ酸200~220、アミノ酸205~225、アミノ酸210~230、アミノ酸215~235、アミノ酸220~240、アミノ酸225~245、アミノ酸230~250、アミノ酸235~255、アミノ酸240~260、アミノ酸245~265、アミノ酸250~270、アミノ酸255~275、アミノ酸260~276、アミノ酸148~175、アミノ酸150~175、アミノ酸150~180、アミノ酸150~185、アミノ酸150~190、アミノ酸150~195、アミノ酸150~200、アミノ酸150~205、アミノ酸150~210、アミノ酸150~215、アミノ酸150~220、アミノ酸150~225、アミノ酸150~230、アミノ酸150~235、アミノ酸150~240、アミノ酸150~245、アミノ酸150~250、アミノ酸150~255、アミノ酸150~260、アミノ酸150~265、アミノ酸150~270、アミノ酸150~275、アミノ酸150~276、アミノ酸190~240、アミノ酸190~276、アミノ酸240~276、アミノ酸242~276、アミノ酸161~181、アミノ酸162~181、アミノ酸182~240、アミノ酸182~241、およびアミノ酸182~276からなる群から選択される。アプタマーは、好ましくは、100 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形もしくは1つ以上の部分に対する解離定数を含む。

【0166】

本発明は、配列番号11のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤(TFPI)ポリペプチドに結合するアプタマーも提供し、アプタマーは、TFPIによって媒介される血液凝固の阻害を調節し、TFPIへの結合において、配列番号4(ARC19499)

10

20

30

40

50

、配列番号1 (ARC 26835)、配列番号2 (ARC 17480)、配列番号3 (ARC 19498)、配列番号5 (ARC 19500)、配列番号6 (ARC 19501)、配列番号7 (ARC 31301)、配列番号8 (ARC 18546)、配列番号9 (ARC 19881)、および配列番号10 (ARC 19882) からなる群から選択される核酸配列を含む参照アプタマーと競合する。好ましくは、参照アプタマーは、配列番号4の核酸配列 (ARC 19499) を含む。

【0167】

本発明はさらに、配列番号11のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) ポリペプチドに結合するアプタマーを提供し、アプタマーは、アプタマーにより認識される領域の少なくとも一部が、第VIIa因子、第Xa因子、または第VIIa因子および第Xa因子の両方で結合されるTFPI領域と異なるTFPIの直線部分または等角部分に結合する。好ましくは、アプタマーは、アミノ酸残基148～170、アミノ酸残基150～170、アミノ酸残基155～175、アミノ酸残基160～180、アミノ酸残基165～185、アミノ酸残基170～190、アミノ酸残基175～195、アミノ酸残基180～200、アミノ酸残基185～205、アミノ酸残基190～210、アミノ酸残基195～215、アミノ酸残基200～220、アミノ酸残基205～225、アミノ酸残基210～230、アミノ酸残基215～235、アミノ酸残基220～240、アミノ酸残基225～245、アミノ酸残基230～250、アミノ酸残基235～255、アミノ酸残基240～260、アミノ酸残基245～265、アミノ酸残基250～270、アミノ酸残基255～275、アミノ酸残基260～276、アミノ酸残基148～175、アミノ酸残基150～175、アミノ酸残基150～180、アミノ酸残基150～185、アミノ酸残基150～190、アミノ酸残基150～195、アミノ酸残基150～200、アミノ酸残基150～205、アミノ酸残基150～210、アミノ酸残基150～215、アミノ酸残基150～220、アミノ酸残基150～225、アミノ酸残基150～230、アミノ酸残基150～235、アミノ酸残基150～240、アミノ酸残基150～245、アミノ酸残基150～250、アミノ酸残基150～255、アミノ酸残基150～260、アミノ酸残基150～265、アミノ酸残基150～270、アミノ酸残基150～275、アミノ酸残基150～276、アミノ酸残基190～240、アミノ酸残基190～276、アミノ酸残基240～276、アミノ酸残基242～276、アミノ酸残基161～181、アミノ酸残基162～181、アミノ酸残基182～240、アミノ酸残基182～241、およびアミノ酸残基182～276からなる群から選択される配列番号11のアミノ酸配列の少なくとも一部を含む1つ以上の領域に結合する。より好ましくは、アプタマーは、TFPIへの結合において、配列番号4の核酸配列 (ARC 19499) を含む参照アプタマーと競合する。

【0168】

本発明は、配列番号4の核酸配列 (ARC 19499) を含むTFPIアプタマーで結合される領域と同一の、配列番号11のアミノ酸配列を有するヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) ポリペプチドの領域に結合するアプタマーも提供する。

【0169】

本発明はさらに、配列番号11の1つ以上の部分を含むヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) ポリペプチドの領域に結合するアプタマーを提供し、1つ以上の部分は、アミノ酸残基148～170、アミノ酸残基150～170、アミノ酸残基155～175、アミノ酸残基160～180、アミノ酸残基165～185、アミノ酸残基170～190、アミノ酸残基175～195、アミノ酸残基180～200、アミノ酸残基185～205、アミノ酸残基190～210、アミノ酸残基195～215、アミノ酸残基200～220、アミノ酸残基205～225、アミノ酸残基210～230、アミノ酸残基215～235、アミノ酸残基220～240、アミノ酸残基225～245、アミノ酸残基230～250、アミノ酸残基235～255、アミノ酸残基240～260、アミノ酸残基245～265、アミノ酸残基250～270、アミノ酸残基255～275、アミノ酸残基260～276、アミノ酸残基148～175、アミノ酸残基150～175、ア

ミノ酸残基150～180、アミノ酸残基150～185、アミノ酸残基150～190、アミノ酸残基150～195、アミノ酸残基150～200、アミノ酸残基150～205、アミノ酸残基150～210、アミノ酸残基150～215、アミノ酸残基150～220、アミノ酸残基150～225、アミノ酸残基150～230、アミノ酸残基150～235、アミノ酸残基150～240、アミノ酸残基150～245、アミノ酸残基150～250、アミノ酸残基150～255、アミノ酸残基150～260、アミノ酸残基150～265、アミノ酸残基150～270、アミノ酸残基150～275、アミノ酸残基150～276、アミノ酸残基190～240、アミノ酸残基190～276、アミノ酸残基240～276、アミノ酸残基242～276、アミノ酸残基161～181、アミノ酸残基162～181、アミノ酸残基182～240、アミノ酸残基182～241、およびアミノ酸残基182～276からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0170】

本発明はさらに、ヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合し、以下の性質：a）TFPIへの結合において、配列番号1～10のうちのいずれか1つと競合すること、b）第Xa因子のTFPI阻害を阻害すること、c）血友病血漿におけるトロンビン生成を増加させること、d）内因性テナーゼ複合体のTFPI阻害を阻害すること、e）全血および血漿においてトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））で測定される、正常な止血を回復させること、f）より短い凝固時間、より迅速な血栓形成、またはより安定した血栓の発達によって示される、全血および血漿においてトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））もしくは回転式トロンボエラストメトリー（ROTEM）で測定される、正常な凝固を回復させること、g）希釈プロトロンビン時間（dPT）、組織因子活性凝固時間（TF-ACT）、または任意の他のTFPI感受性凝固時間測定で測定される、凝固時間を減少させることのうちの1つ以上を示すアプタマーを提供する。

【0171】

本発明は、ヒト組織因子経路阻害剤に結合するアプタマーも提供し、アプタマーは、TFPIへの結合において、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10からなる群から選択される参照アプタマーと競合する。

【0172】

本発明はさらに、組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーを提供し、アプタマーは、TFPIへの結合において、直接的または間接的のいずれかで、AD4903からなる群から選択される参照抗体と競合する。

【0173】

本発明は、ヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合し、配列番号4のヌクレオチド配列を有するステムループモチーフを含むアプタマーも提供し、a）ヌクレオチド1、2、3、4、6、8、11、12、13、17、20、21、22、24、28、30、および32のうちの任意の1つ以上が、2'-OMe置換から2'-デオキシ置換に修飾されてもよく、b）ヌクレオチド5、7、15、19、23、27、29、および31のうちの任意の1つ以上が、2'-OMeウラシルから2'-デオキシウラシルまたは2'-デオキシチミンのいずれかに修飾されてもよく、c）ヌクレオチド18が、2'-OMeウラシルから2'-デオキシウラシルに修飾されてもよく、かつ/またはd）ヌクレオチド14、16、および25のうちの任意の1つ以上が、2'-デオキシシトシンから2'-OMeシトシンまたは2'-フルオロシトシンのいずれかに修飾されてもよい。

【0174】

本発明はさらに、ヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合し、配列番号2のヌクレオチド7～28を含むアプタマーを提供する。

【0175】

本発明はさらに、上記のアプタマーのうちのいずれか1つを投与することを含む、出血障害を治療するための方法を提供する。

【0176】

本発明はさらに、組織因子経路阻害剤（TFPI）に結合するアプタマーを提供し、アプタマーは、配列番号4、1、2、3、5、6、7、8、9、および10からなる群から選択される一次核酸配列を含む。アプタマーの一次核酸配列は、任意の修飾（2'-Oメチル、2'-フルオロ修飾、3T、またはPEG等）なしで、単独でヌクレオチド（アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン）を指す。

【0177】

アプタマー医薬品化学

TFPIに結合するアプタマーが特定された時点で、いくつかの技術を、特定されたアプタマー配列の結合、安定性、効力、および／または機能的特性をさらに増加させるために任意で実行することができる。

10

【0178】

TFPIに結合するアプタマーは、所望の結合および／または機能的特性を有する最小のアプタマー配列（本明細書で「最小化構築物」または「最小化アプタマー」とも称される）を得るために切断型であり得る。これを達成するための1つの方法は、最小化構築物の設計の情報を得るために、折り畳みプログラムおよび配列分析を使用する、例えば、選択物から得られたクローン配列をアライメントし、保存モチーフおよび／または共変動を探し求めることによるものである。好適な折り畳みプログラムは、例えば、RNA構造プログラム（Mathews, D. H. ; Disney, M. D. ; Childs, J. L. ; Schroeder, S. J. ; Zuker, M. ; and Turner, D. H. , "Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure," 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences, US, 101, 7287-7292）を含む。生化学的プロービング実験を、アプタマー配列の5'および3'境界を決定し、最小化構築物の設計の情報を得るために実行することもできる。次いで、最小化構築物を化学的に合成し、それらが由来した非最小化配列と比較した結合および機能的特性について試験することができる。一連の5'、3'、および／または内部欠失を含有するアプタマー配列の変形を、直接化学的に合成し、それらが由来した非最小化アプタマー配列と比較した結合および／または機能的特性について試験することもできる。

20

30

【0179】

さらに、ドープ再選択を用いて、単一の活性アプタマー配列または単一の最小化アプタマー配列内の配列要求性を調査することができる。ドープ再選択を、目的の単一配列に基づいて設計された合成の縮重プールを用いて実行する。縮重のレベルは、通常、野生型配列、すなわち、目的の単一配列と70%～85%異なる。概して、中立変異を伴う配列は、ドープ再選択プロセスを介して特定され、いくつかの場合において、配列変化は、親和性の改善をもたらし得る。次いで、ドープ再選択を用いて特定された複合配列情報を使用して、最小の結合モチーフを特定し、最適化の取り組みを支援することができる。

【0180】

アプタマー配列および／または最小化アプタマー配列を、アプタマー医薬品化学を用いてSELEX（商標）後に最適化し、結合親和性および／または機能的特性を増加させるか、またはあるいは、配列中のどの位置が結合活性および／または機能的特性に必須であるかを決定することができる。

40

【0181】

アプタマー医薬品化学は、複数組の変形アプタマーが化学的に合成されるアプタマー改善技術である。これらの複数組の変形は、典型的には、単一置換基の導入の点で親アプタマーとは異なり、この置換基の位置の点で相互に異なる。次に、これらの変形を、相互および親アプタマーと比較する。特性における改善は十分に著しくあり得るため、特定の治療基準を得るのに単一置換基を含むことはそれほど必要ではない。

50

【0182】

あるいは、一組の単一変形から収集される情報を用いて、2つ以上の置換基が同時に導入されるさらに複数の組の変形を設計することができる。一設計戦略において、単一置換基変形の全てを順位付けし、上位の4つを選択し、これらの4つの単一置換基変形の全ての可能性のある2つ1組（6種類）、3つ1組（4種類）、および4つ1組（1種類）を合成およびアッセイする。第2の設計戦略において、最良の単一置換基変形を新規の親と見なし、この最高順位の単一置換基変形を含む2つ1組の置換基変形を合成およびアッセイする。他の戦略を用いてもよく、これらの戦略を、さらに改善された変形を特定し続けながら、置換基の数が徐々に増加するように、繰り返し適用することができる。

【0183】

アプタマー医薬品化学を、特に全体的というよりはむしろ、局所的な置換基の導入を調査する方法として用いることができる。アプタマーが転写により生成されるライブラリ内で発見されるため、S E L E X（商標）プロセス中に導入される任意の置換基は、全体的に導入されるはずである。例えば、ヌクレオチド間にホスホロチオエート結合を導入することが所望される時、本結合は、全体的に置換される場合に、Aすべて（またはG、C、T、Uすべて等）でのみ導入することができる。ホスホロチオエートをいくつかのA（またはいくつかのG、C、T、U等）（局所的置換）で必要とするが、他のA（またはいくつかのG、C、T、U等）ではそれを許容することができないアプタマーを、本プロセスでは容易に発見することができない。

【0184】

アプタマー医薬品化学プロセスで利用することができる置換基の種類は、それらをオリゴマー合成スキームに導入する能力によってのみ制限される。本プロセスは、ヌクレオチドのみに限定されることはない。アプタマー医薬品化学スキームは、立体的嵩高さ、疎水性、親水性、親油性、疎油性、正電荷、負電荷、中性電荷、双性イオン、分極率、ヌクレアーゼ抵抗性、立体構造の剛性、立体構造の柔軟性、タンパク質結合特性、質量等を導入する置換基を含み得る。アプタマー医薬品化学スキームは、塩基修飾、糖修飾、またはホスホジエステル結合修飾を含み得る。

【0185】

治療アプタマーの脈絡において有益であると思われる置換基の種類を考慮する時、以下のカテゴリー：

- （1）体内にすでに存在している置換基、例えば、2'-デオキシ、2'-リボ、2'-O-メチルヌクレオチド、イノシン、もしくは5-メチルシトシン、
 - （2）承認された治療の一環である置換基、例えば、2'-フルオロヌクレオチド、または
 - （3）上記の2つのカテゴリーのうちの1つに加水分解、分解、もしくは代謝する置換基、例えば、メチルホスホネート結合オリゴヌクレオチドもしくはホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチド
- のうちの1つ以上に分類される置換を導入することが望ましくあり得る。

【0186】

本発明のアプタマーは、本明細書に記載のアプタマー医薬品化学を介して開発されるアプタマーを含む。

【0187】

本発明のアプタマーの標的結合親和性を、アプタマーと標的（例えば、タンパク質）との間の一連の結合反応を介して評価することができ、微量の³²P-標識アプタマーを標的の希釈系列とともに緩衝媒体中でインキュベートし、次いで、真空濾過マニホールドを用いてニトロセルロース濾過により分析する。本明細書でドットプロット結合アッセイと称される場合、本方法は、ニトロセルロース、（上から下に）ナイロンフィルター、およびゲルプロット紙から成る3層の濾過媒体を用いる。標的に結合されるアプタマーがニトロセルロースフィルター上に捕捉される一方で、非標的結合されたアプタマーは、ナイロンフィルター上に捕捉される。ゲルプロット紙を、他のフィルターの支持媒体として含む。

濾過後、フィルター層を分離し、乾燥させ、蛍光面上に曝露し、蛍光画像システムを用いて定量化する。定量化された結果を用いて、アプタマー結合曲線を生成することができ、これから解離定数 (K_D) を算出することができる。好ましい実施形態において、結合反応を実行するために用いられる緩衝媒体は、 $1 \times$ ダルベッコの PBS (Ca^{++} および Mg^{++} を含む) + 0.1 mg/mL BSA である。

【0188】

概して、標的の機能的活性を調節するアプタマーの能力をインビトロおよびインビボモデルを用いて評価することができ、標的の生物学的機能により異なる。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、既知の標的の生物学的機能を阻害し得る。他の実施形態において、本発明のアプタマーは、既知の標的の生物学的機能を刺激し得る。本発明のアプタマーの機能的活性を、既知の TFPI の機能を測定するよう設計されたインビトロおよびインビボモデルを用いて評価することができる。

10

【0189】

アプタマー配列および／または最小化アプタマー配列を、アプタマー配列および／または最小化アプタマー配列の安定性を最適化するように、切断部位および修飾の部位特異的特定のための代謝特性で指向されたアプタマー医薬品化学を用いて最適化することもできる。

【0190】

代謝特性で指向されたアプタマー医薬品化学は、親アプタマーを試験流体とともにインキュベートし、混合物をもたらすことを含む。次いで、混合物を分析して、インキュベート後の親アプタマーの消失速度または残存するアプタマーの量もしくは割合、特異的アプタマー代謝特性、および特異的アプタマー代謝産物配列を決定する。形成される特異的代謝産物の配列を知ることは、代謝産物の質量に基づいてヌクレアーゼ切断の部位を特定することを可能にする。代謝プロファイリングを体系的に行い、特異的アプタマー切断部位を特定した後、本方法は、アプタマー配列および／または最小化アプタマー配列の安定性を最適化するよう設計される切断部位もしくはその付近で化学的置換または修飾を導入することを含む。

20

【0191】

一実施形態において、アプタマーは、a) 親アプタマーを試験流体とともにインキュベートして混合物をもたらすこと、b) 混合物を分析して親アプタマーの代謝産物を特定し、それにより、親アプタマー中の少なくとも1つのアプタマー切断部位を検出すること、ならびに c) 少なくとも1つのアプタマー切断部位に近接した位置で化学的置換を導入して修飾アプタマーをもたらすことにより特定および修飾される。このことは、アプタマーの安定性、具体的には、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼへのアプタマーの安定性を強化する。

30

【0192】

いくつかの実施形態において、試験流体は、生物学的マトリックス、具体的には、血清、血漿、脳脊髄液、細胞画分、S9画分、およびミクロソーム画分を含む組織抽出物、房水、硝子体液、ならびに組織ホモジネートのうちの1つ以上からなる群から選択される生物学的マトリックスである。いくつかの実施形態において、生物学的マトリックスは、マウス、ラット、サル、ブタ、ヒト、イヌ、テンジクネズミ、およびウサギのうちの1つ以上からなる群から選択される種由来である。いくつかの実施形態において、試験流体は、少なくとも1つの精製された酵素、具体的には、ヘビ毒ホスホジエステラーゼおよび DNAse I からなる群から選択される少なくとも1つの精製された酵素を含む。

40

【0193】

いくつかの実施形態において、分析するステップは、液体クロマトグラフィーおよび質量分析法、具体的には、電子噴霧イオン化液体クロマトグラフィー質量分析法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、またはキャピラリー電気泳動法を用いて得られたアプタマーを分析して、少なくとも1つのアプタマー切断部位の位置を決定することを含む。いくつかの実施形態において、分析するステップは、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (P

50

AGE)、キャピラリー電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS)、具体的には、LC/MS/MSまたはLC/MS/MS/MS、より具体的には、エレクトロスプレーオン化LC/MS (ESI-LC/MS)、ESI-LC/MS/MS、およびESI-LC/MS/MS/MSのうちの1つ以上からなる群から選択される生物学的分析法を用いて得られたアプタマーを分析することを含む。

【0194】

いくつかの実施形態において、近接した位置は、アプタマー切断部位に対して直ぐ5'側の位置、アプタマー切断部位からヌクレオチド3個以内の5'側の位置、アプタマー切断部位に対して直ぐ3'側の位置、アプタマー切断部位からヌクレオチド3個以内の3'側の位置、および切断されたヌクレオチド間連結の位置からなる群から選択される位置を含む。

10

【0195】

いくつかの実施形態において、化学的置換は、糖位置での化学的置換、塩基位置での化学的置換、およびヌクレオチド間連結での化学的置換からなる群から選択される。より具体的には、置換は、異なるヌクレオチドへのヌクレオチド置換、ピリミジンへのプリン置換、任意のヌクレオチドへの2'-アミン置換、ウリジンへの2'-デオキシジヒドロウリジン置換、シチジンへの2'-デオキシ-5-メチルシチジン置換、プリンへの2'-アミノプリン置換、リン酸ジエステルへのホスホロチオエート置換、リン酸ジエステルへのホスホロジチオエート置換、2'-OHヌクレオチド、2'-OMeヌクレオチド、もしくは2'-フルオロヌクレオチドへの2'-デオキシヌクレオチド置換、2'-OHヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、もしくは2'-フルオロヌクレオチドへの2'-OMeヌクレオチド置換、2'-OHヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、もしくは2'-OMeヌクレオチドへの2'-フルオロヌクレオチド置換、または2'-OH、2'-フルオロ、もしくは2'-デオキシヌクレオチドへの2'-O-メトキシエチルヌクレオチド置換、2'-フルオロヌクレオチドへの2'-O-メトキシエチルヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチド置換、および1つ以上のPEGもしくは他のポリマーまたは他のPKもしくは分布に影響を与える構成要素の添加からなる群から選択される。

20

【0196】

さらなる実施形態において、これらの方法の導入するステップはさらに、1つ以上の切断部位もしくは単一の切断部位またはそれらの両方で2つ以上の化学的置換を導入することを含む。

30

【0197】

2つ以上のアプタマー切断部位が検出される別の実施形態において、これらの方法の導入するステップはさらに、インキュベートするステップ中の時間内に最初に起こるよう決定されたアプタマー切断部位の関連した近接位置で、または化学的置換の導入時に所望の性質を提供する任意の他の切断部位で少なくとも1つの化学的置換を導入することを含む。

【0198】

他の実施形態において、これらの方法はさらに、試験流体における修飾アプタマーの安定性を試験するステップを含む。いくつかの実施形態において、アプタマーの安定性は、試験流体中で無傷のままである親アプタマーの割合と比較した、試験流体中で無傷のままである修飾アプタマーの割合を決定することにより評価される。いくつかの実施形態において、無傷のアプタマー割合は、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE)、キャピラリー電気泳動法、HPLCおよびLC/MS、具体的には、LC/MS/MSまたはLC/MS/MS/MS、より具体的には、ESI-LC/MS、ESI-LC/MS/MS、およびESI-LC/MS/MS/MSのうちの1つ以上からなる群から選択される生物学的分析法により評価される。他の実施形態において、修飾アプタマーは、試験流体において親アプタマーよりも安定しており、好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍、最も好ましくは少なくとも10倍安定している。

40

【0199】

50

さらなる実施形態において、これらの方法はさらに、その標的に対する修飾アプタマーの解離定数または IC_{50} を決定することを含む。いくつかの実施形態において、化学的置換は、アプタマーのそれぞれの位置で単独で導入されるか、あるいは様々な組み合わせで導入され、それぞれの得られたアプタマーに対する解離定数または IC_{50} が決定される。化学的置換は、単一の化学修飾が親アプタマーの解離定数以下である修飾アプタマーに対する解離定数をもたらしように、アプタマー切断部位に近接した位置で導入される。本発明の別の実施形態において、本方法は、親アプタマーの解離定数または IC_{50} 以下であるその標的に対する解離定数または IC_{50} を有する修飾アプタマーを選択することを含む。

【0200】

他の実施形態において、修飾アプタマーは、生物学的活性を有する標的に結合し、本方法はさらに、修飾アプタマーの存在および不在で標的の生物学的活性を試験することを含む。別の実施形態において、方法はさらに、親アプタマーの生物学的活性と同一であるか、あるいはそれよりも良好である生物学的活性を有する標的に結合する修飾アプタマーを選択することを含む。生物学的活性を、ELISA アッセイまたは細胞に基づいたアッセイ等の任意の関連アッセイで測定することができる。

【0201】

いくつかの実施形態において、インキュベートするステップ、分析するステップ、導入するステップ、および試験するステップは、所望の安定性が得られるまで反復的に繰り返される。

【0202】

本発明のアプタマーを、当業者により採用される任意の数の技術に従って、日常的に診断目的に適合させることができる。診断における利用は、インビボおよびインビトロ診断的適用の両方を含み得る。診断薬は、ユーザが特定の場所または濃度で所与の標的の存在を特定することを可能にするのみ必要とする。単に標的を伴って結合対を形成する能力は、診断目的に肯定的なシグナルを引き起こすのに十分であり得る。当業者は、当技術分野で既知の手順により任意のアプタマーを適合させ、そのようなリガンドの存在を追跡するために標識タグを組み込むこともできるであろう。そのようなタグを、いくつかの診断手順において用いる場合もある。

【0203】

免疫刺激モチーフを有するアプタマー

本発明は、TFPI に結合し、その生物学的機能を調節するアプタマーを提供する。

【0204】

脊椎動物の免疫系による細菌DNAの認識は、特定の配列状況における非メチル化CpGジヌクレオチドの認識（「CpGモチーフ」）に基づく。そのようなモチーフを認識する1つの受容体は、はっきり異なる微生物成分を認識することで先天性免疫応答に関与するToll様の受容体のファミリーメンバー（約10個のメンバー）であるToll様の受容体9（「TLR9」）である。TLR9は、配列特異的様式で非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド（「ODN」）CpG配列により活性化される。CpGモチーフの認識は、先天性免疫応答および最終的には後天性免疫応答につながる防御機構を引き起こす。例えば、マウスにおけるTLR9の活性化は、抗原提示細胞の活性化、MHCクラスIおよびII分子の上方調節、ならびに重要な共刺激分子とIL-12およびIL-23を含むサイトカインの発現を引き起こす。この活性化は、TH1サイトカインIFN-γの強固な上方調節を含むB細胞およびT細胞応答を、直接的および間接的の両方で強化する。集合的に、CpG配列への応答は、感染病からの保護、ワクチンへの改善された免疫応答、喘息に対する効果的な応答、および改善された抗体依存性細胞媒介性細胞毒性につながる。したがって、CpG ODNは、感染病からの保護を提供し、免疫アジュバントまたは癌治療薬（単剤療法またはmAbもしくは他の治療との併用）として機能することができる。喘息およびアレルギー反応を低下させることができる。

【0205】

CpGモチーフの多種多様の異なるクラスが特定されており、それぞれ、認識時に、異なるカスケードの事象、サイトカインおよび他の分子の放出、ならびにある特定の細胞の活性化をもたらす。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20:709-760を参照されたい。さらなる免疫刺激モチーフが、以下の米国特許：米国特許第6,207,646号、米国特許第6,239,116号、米国特許第6,429,199号、米国特許第6,214,806号、米国特許第6,653,292号、米国特許第6,426,334号、米国特許第6,514,948号、および米国特許第6,498,148号に開示されており、それぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。これらのCpGまたは他の免疫刺激モチーフのうちのいずれかを、アプタマーに組み込むことができる。アプタマーの選択は、治療される疾患または障害によって決まる。好ましい免疫刺激モチーフは、「r」がプリンを示し、「y」がピリミジンを示し、「X」が任意のヌクレオチドを示す、以下の通り（5'から3'、左から右に示される）：AACGTTTCGAG（配列番号12）、AACGTT、ACGT、rCGy、rrCGyy、XCGX、XXCGXX、およびX₁X₂CGY₁Y₂であり、式中、X₁はGまたはAであり、X₂Cではなく、Y₁はGではなく、Y₂は好ましくはTである。

【0206】

CpGモチーフがCpGモチーフに結合することで既知の標的以外の特定の標的（「非CpG標的」）に結合するアプタマーに組み込まれ、結合時に免疫応答を刺激する例において、CpGは、好ましくは、アプタマーの非必須領域に配置される。アプタマーの非必須領域を、部位特異的変異原性、欠失分析、および／または置換分析により特定することができる。しかしながら、非CpG標的に結合するアプタマーの能力を著しく妨害しない任意の位置を用いることができる。アプタマー配列内に埋め込まれることに加えて、CpGモチーフを、5'末端および3'末端のいずれかまたはそれら両方に付加するか、またはさもなければアプタマーに結合することができる。非CpG標的に結合するアプタマーの能力が著しく妨害されない限り、結合の任意の位置または手段を用いることができる。

【0207】

本明細書で使用される「免疫応答の刺激」は、（1）特定の応答の誘導（例えば、Th1応答の誘導）またはある特定の分子の生成、あるいは（2）特定の応答の阻害もしくは抑制（例えば、Th2応答の阻害もしくは抑制）またはある特定の分子の阻害もしくは抑制のいずれかを意味し得る。

【0208】

1つ以上のCpGまたは他の免疫刺激配列を有するアプタマーを含む本発明のアプタマーを、例えば、本明細書に記載のSELEX（商標）プロセスを用いた多種多様の戦略により特定または生成することができる。組み込まれる免疫刺激配列は、DNA、RNA、置換DNAもしくはRNA、および／または置換もしくは非置換DNA/RNAの組み合わせであり得る。概して、戦略を2つの群に分類することができる。戦略の両方の群に関して、CpGモチーフは、a) 抑制された免疫応答が疾患の発症に関連する状況（すなわち、AIDS等の免疫不全症）に対抗するよう免疫応答を刺激するため、およびb) 特定の標的もしくは細胞型（すなわち、癌細胞）に対する刺激された免疫応答に焦点を合わせるため、あるいは免疫応答をTH2もしくはTH17状態から離れてTH1状態に向かうよう偏らせるために含まれる（すなわち、アレルギー状態に対抗するためにIgE等の抗アレルギー標的に対するアプタマー中のCpGモチーフを含む）。

【0209】

第1群において、戦略は、CpGモチーフまたは他の免疫刺激配列ならびに標的への結合部位の両方を含むアプタマーを特定もしくは生成することを対象とし、標的（以下「非CpG標的」）は、CpGモチーフまたは他の免疫刺激配列を認識することで既知の標的以外の標的である。本発明のいくつかの実施形態において、非CpG標的は、TFPI標的である。この群の第1の戦略は、CpGモチーフが固定領域または固定領域の一部として

プールのそれぞれのメンバーに組み込まれたオリゴヌクレオチドプールを用いて（例えば、いくつかの実施形態において、プールメンバーのランダム化領域がその中に組み込まれたCpGモチーフを有する固定領域を含む）、SELEX（商標）を実行して特定の非CpG標的、好ましくは標的に対するアダマーを得ること、およびCpGモチーフを含むアダマーを特定することを含む。この群の第2の戦略は、SELEX（商標）を実行して特定の非CpG標的を得ること、および選択後に、CpGモチーフを5'および/または3'末端に付加するか、あるいはCpGモチーフをアダマーの領域、好ましくは非必須領域に組み込むことを含む。この群の第3の戦略は、SELEX（商標）を実行して特定の非CpG標的に対するアダマーを得ることであり、プールの合成中に、プールのそれぞれのメンバーのランダム化領域がCpGモチーフ中で濃縮されるように1つ以上のヌクレオチド付加ステップにおいて様々なヌクレオチドのモル比を偏らせること、およびCpGモチーフを含むアダマーを特定することを含む。この群の第4の戦略は、SELEX（商標）を実行して特定の非CpG標的に対するアダマーを得ること、およびCpGモチーフを含むアダマーを特定することを含む。この群の第5の戦略は、SELEX（商標）を実行して特定の非CpG標的に対するアダマーを得ること、および結合時に免疫応答を刺激するがCpGモチーフを含まないアダマーを特定することを含む。

10

【0210】

第2群において、戦略は、CpGモチーフ（例えば、TLR9または他のtol様受容体）の受容体により結合され、結合時に免疫応答を刺激するCpGモチーフおよび/または他の配列を含むアダマーを特定もしくは生成することを対象とする。この群の第1の戦略は、CpGモチーフが固定領域または固定領域の一部としてプールのそれぞれのメンバーに組み込まれたオリゴヌクレオチドプールを用いて（例えば、いくつかの実施形態において、プールメンバーのランダム化領域がその中に組み込まれたCpGモチーフを有する固定領域を含む）、SELEX（商標）を実行して、CpGモチーフまたは他の免疫刺激配列に結合し、結合時に免疫応答を刺激することで既知の標的に対するアダマーを得ること、およびCpGモチーフを含むアダマーを特定することを含む。この群の第2の戦略は、SELEX（商標）を実行して、CpGモチーフまたは他の免疫刺激配列に結合し、結合時に免疫応答を刺激することで既知の標的に対するアダマーを得ること、およびCpGモチーフを5'および/または3'末端に付加するか、あるいはCpGモチーフをアダマーの領域、好ましくは非必須領域に組み込むことを含む。この群の第3の戦略は、SELEX（商標）を実行して、CpGモチーフまたは他の免疫刺激配列に結合し、結合時に免疫応答を刺激することで既知の標的に対するアダマーを得ることであり、プールの合成中に、プールのそれぞれのメンバーのランダム化領域がCpGモチーフ中で濃縮されるように1つ以上のヌクレオチド付加ステップにおいて様々なヌクレオチドのモル比を偏らせること、およびCpGモチーフを含むアダマーを特定することを含む。この群の第4の戦略は、SELEX（商標）を実行して、CpGモチーフまたは他の免疫刺激配列に結合し、結合時に免疫応答を刺激することで既知の標的に対するアダマーを得ること、およびCpGモチーフを含むアダマーを特定することを含む。この群の第5の戦略は、SELEX（商標）を実行してCpGモチーフまたは他の免疫刺激配列に結合することで既知の標的に対するアダマーを得ること、および結合時に免疫応答を刺激するがCpGモチーフを含まないアダマーを特定することを含む。

20

30

40

【0211】

薬物動態の調節およびアダマー治療の体内分布

アダマーを含む全てのオリゴヌクレオチドに基づく治療の薬物動態学的性質を所望の薬学的適用に一致させることが重要である。アダマーは、器官および組織を標的化するように分布され、所望の投与計画と一致した期間、体内に留まる（未修飾）ことが可能であるはずである。

【0212】

本発明は、アダマー組成物の薬物動態、具体的には、アダマー薬物動態を調整する能力に影響を及ぼす物質および方法を提供する。アダマー薬物動態の調整性（すなわち、

50

調節する能力)は、アプタマーへの修飾部分(例えばPEGポリマー)の共役および/あるいは修飾ヌクレオチド(例えば、2'-フルオロもしくは2'-オームethyl)または修飾ヌクレオチド間連結の組み込みを介して達成され、アプタマーの化学組成物を変化させる。アプタマー薬物動態を調整する能力は、既存の治療適用の改善において、またはあるいは新規の治療適用の改善において用いられる。例えば、いくつかの治療適用において、例えば、迅速な薬物クリアランスまたは薬物遮断が所望される場合もある抗新生物または緊急の医療環境では、抗新生物又は緊急の医療環境において、循環中のアプタマーの滞留時間を減少させることが望ましい。あるいは、他の治療適用において、例えば、治療薬の体循環が所望される維持療法では、アプタマーの滞留時間を増加させることが望ましい。

【0213】

加えて、アプタマー薬物動態の調整性は、対象におけるその治療目的に一致させるよう、アプタマーの体内動態、例えば、吸収、分布、代謝、および排泄(ADME)を補正するために用いられる。アプタマーの薬物動態の調整性は、アプタマーの吸収の様式および程度、体の流体および組織にわたるアプタマーの分布、アプタマーおよびその代謝産物の連続的な代謝的変換、ならびに最終的にアプタマーおよびその代謝産物の排泄に影響を及ぼし得る。例えば、いくつかの治療適用において、特定の種類の組織または特定の器官(もしくは一連の器官)を標的化する目的でアプタマー治療薬の体内分布を変化させること、あるいは特定の細胞型に進入する傾向を増加させることが望ましくあり得る。これらの適用において、アプタマー治療薬は、特定の組織および/または器官内で優先的に分布し、そこに蓄積して、治療効果を引き起こす。他の治療適用において、アプタマー治療薬が罹患組織中に優先的に蓄積するように、細胞のマーカーまたは所与の疾患、細胞傷害、もしくは他の異常な病状に関連する症状を示す組織を標的化することが望ましくあり得る。例えば、アプタマー治療薬のPEG化(例えば、20kDa PEGポリマーもしくは他のポリマーまたは共役構成要素でのPEG化)は、PEG化アプタマー治療薬が炎症組織中に優先的に蓄積するように、炎症組織を標的化するために用いられる。

【0214】

アプタマー治療薬の薬物動態学的特性(例えば、修飾ヌクレオチド等のアプタマー共役体または変化した化学的性質を有するアプタマー)を決定するために、正常な対象、例えば、試験動物もしくはヒト、あるいは罹患対象、例えば、凝固亢進もしくは凝固低下の動物モデル等のTFPI特異的動物モデルまたは凝固欠乏を有するヒトにおいて、多種多様のパラメータが試験される。そのようなパラメータには、例えば、分布または排泄半減期($t_{1/2}$)、血漿クリアランス(CL)、分布容積(Vss)、濃度時間曲線下面積濃度(AUC)、観察された最大血清または血漿濃度(C_{max})、およびアプタマー組成物の平均滞留時間(MRT)が含まれる。本明細書で使用される「AUC」という用語は、アプタマー投与後のアプタマー治療薬の時間に対する血漿濃度曲線下面積を指す。AUC値は、アプタマーの曝露を推定するために用いられ、例えば、皮下投与等の血管外経路での投与後にアプタマーの生物学的利用能を決定するためにも用いられる。生物学的利用能は、静脈内投与後に得られたAUCに対する皮下投与後に得られたAUCの比率を求め、それらを各投与後に用いられる用量に基準化すること(すなわち、同一の用量または基準化された用量で静脈内投与により投与された同一のアプタマーと比較した、皮下投与後に投与されたアプタマーのパーセント比)により決定される。CL値は、体循環からの親アプタマー治療薬の除去の測定である。分布容積(Vd)は、その血漿濃度に対する一時期の体内のアプタマーの量に関係する用語である。Vdは、どの程度薬物が血漿から除去され、組織および/または器官に分布されるかを決定するために用いられる。より大きなVdは、広範な分布、大規模な組織結合、または広範な分布および大規模な組織結合の両方を意味する。3つの基本的な分布容積:(i)濃度時間曲線の戻し外挿から得られたゼロ時間での分布の見かけ容積または最初の容積、(ii)分布が完了した時点でVdssに近似させて計算される容積であり、面積量が排泄動態によって決まる、容積、および(iii)分布が完了した時点で計算される容積がある。パラメータが排泄動態とは無関係であるため、理想的には測定されるはずであるこのパラメータはVdssである。アプタマ

10

20

30

40

50

一の V s s が血液量よりも大きい場合、アプタマーが体循環の外側に分布され、組織または器官中で見つけられる可能性が高いことを示唆する。薬力学的パラメータを、薬物特性を評価するために用いることもできる。

【0215】

アプタマー治療薬（例えば、修飾ヌクレオチド等のアプタマー共役体もしくは変化した化学的性質を有するアプタマー）の分布を決定するために、正常な動物または罹患した標的の特異性動物モデルに投与される放射標識したアプタマーを用いた組織分布の研究または量的全身オートラジオグラフィが用いられる。特定の部位における放射標識したアプタマーの蓄積を定量化することができる。

【0216】

安定化アプタマー等の本明細書に記載のアプタマーの薬物動態および体内分布を、小分子、ペプチド、もしくはポリマー等を含むが、それらに限定されない調節部分にアプタマーを共役させることにより、または修飾ヌクレオチドをアプタマーに組み込むことにより、制御された様式で調節することができる。修飾部分の共役および／またはヌクレオチド化学組成物の改変は、循環中のアプタマー滞留時間ならびに組織および細胞での分布の基本的な態様を変化させる。

【0217】

ヌクレアーゼによる代謝に加えて、オリゴヌクレオチド治療薬は、腎臓濾過による排泄を受けやすい。そのため、静脈内投与されるヌクレアーゼに耐性を示すオリゴヌクレオチドは、典型的には、濾過を阻止することができない場合、30分未満のインビボ半減期を示す。これを、血流から組織内への急速な分布を促進すること、またはオリゴヌクレオチドの見かけ分子量を糸球体の有効なカットオフサイズを超えて増大させることのいずれかにより達成することができる。以下に説明されるように、PEGポリマーへの小分子量治療薬の共役（PEG化）は、循環中のアプタマーの滞留時間を劇的に延長し、それにより、投薬頻度を減少させ、血管標的に対する有効性を増大させることができる。

【0218】

修飾ヌクレオチドを、アプタマーの血漿クリアランスを調節するために用いることもできる。例えば、インビトロおよびインビボで高度のヌクレアーゼ耐性を示すため現世代のアプタマーの典型である、例えば、2'-フルオロ、2'-OMe、および／またはホスホロチオエート安定化化学的性質を組み込む非共役アプタマーは、未修飾アプタマーと比較した時に、組織、主に肝臓および腎臓内への急速な分布を示す。

【0219】

PAG誘導体化核酸

上で説明され、図11に示されるように、高分子量の非免疫原性ポリマーでの核酸の誘導体化は、それらをより有効および／または安全な治療薬にする、核酸の薬物動態学的性質および薬力学的性質を変化させる生成能を有する。活性における好ましい変化は、ヌクレアーゼによる分解に対する耐性の増加、腎臓濾過の低下、免疫系に対する曝露の減少、および体内の治療薬の分布の変化を含み得る。

【0220】

本発明のアプタマー組成物を、1つ以上のポリアルキレングリコール（「PAG」）部分で誘導体化することができる。本発明で用いられる典型的なポリマーは、ポリエチレンオキシド（「PEO」）としても既知のポリエチレングリコール（「PEG」）およびポリプロピレングリコール（ポリイソプロピレングリコールを含む）を含む。さらに、異なるアルキレンオキシドのランダムまたはブロックコポリマーを多数の適用において用いることができる。一般的な形態において、PEG等のポリアルキレングリコールは、各末端で終了するヒドロキシル基を有する線状ポリマー、すなわち、 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ である。このポリマー、アルファー、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコールを $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$ で表すこともでき、 $-\text{PEG}-$ の記号は、以下の構造単位： $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ を表すことが理解され、式中、 n は、典型的には4～10、000に及ぶ。

10

20

30

40

50

【0221】

治療指標に好適なPAGポリマーは、典型的には、水および多数の有機溶媒溶解性、毒性の欠如、ならびに免疫原性の欠如の性質を有する。PAGの一用途は、ポリマーを不溶性分子に共有結合し、得られたPAG分子「共役体」を可溶性にすることである。例えば、非水溶性薬物バクリタキセルは、PEGにカップリングする時に水溶性になることが示された。Greenwald, et al., J. Org. Chem., 60:331-336 (1995)。PAG共役体は、溶解性および安定性を強化するのみならず、体内の分子の血液循環半減期ならびに後に分布を延長するために用いられることが多い。

【0222】

本発明のアプタマーに共役されるPAG誘導体化化合物は、典型的には、5～80kDaの大きさであるが、任意の大きさを用いることができ、選択はアプタマーおよび適用によって決まる。本発明の他のPAG誘導体化化合物は、10～80kDaの大きさである。本発明のさらに他のPAG誘導体化化合物は、10～60kDaの大きさである。いくつかの実施形態において、本発明の組成物に誘導体化されるPAG部分は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100kDaの大きさの範囲の分子量を有するPEG部分である。いくつかの実施形態において、PEGは線状PEGである一方で、他の実施形態において、PEGは分岐PEGである。さらに他の実施形態において、PEGは、図6に示されるように、40kDaの分岐PEGである。いくつかの実施形態において、40kDaの分岐PEGは、図7に示されるように、アプタマーの5'末端に結合される。

【0223】

高分子量のPEG（超10kDa）の生成は困難であり、非能率的であり、高価であり得る。高分子量のPEG核酸共役体を合成するために、より高い分子量の活性化PEGが生成される。そのような分子を生成するための方法は、線状活性化PEGの形成、またはそこで2つ以上のPEGが活性化基を担持する中核に結合される分岐活性化PEGの形成を含む。これらのより高い分子量のPEG分子の末端部分、すなわち、比較的非反応性ヒドロキシル（-OH）部分を、化合物上の反応部位での他の化合物へのPEGのうちの1つ以上の結合のために活性化するか、あるいは官能基に変換することができる。分岐活性化PEGは、3つ以上の終点を有し、2つ以上の終点が活性化された場合、そのようなより高い分子量の活性化PEG分子は、本明細書で多活性化PEGと称される。いくつかの場合において、分岐PEG分子中の全ての終点が活性化されるわけではない。分岐PEG分子の任意の2つの終点が活性化される場合、そのようなPEG分子は、二活性化PEGと称される。分岐PEG分子中の1つの末端のみが活性化される場合、そのようなPEG分子は、単活性化と称される。他の場合において、線状PEG分子は、二官能性であり、「PEGジオール」と称されることもある。PEG分子の末端部分は、化合物上の反応部位での他の化合物へのPEGの結合のために活性化するか、あるいは官能基に変換することができる、比較的非反応性ヒドロキシル部分、-OH基である。そのような活性化されたPEGジオールは、本明細書で同一二活性化PEGと称される。分子は、多種多様の当技術分野で認識される技術のいずれかを用いて生成される。先に説明された方法のうちの1つを用いてPEGを活性化することに加えて、PEG分子の末端アルコール官能性の1つまたは両方を、核酸への異なる種類の共役を可能にするよう改変することができる。例えば、末端アルコール官能性のうちの1つをアミンまたはチオールに変換することは、尿素およびチオウレタン共役体へのアクセスを可能にする。他の官能性は、例えば、マレイミドおよびアルデヒドを含む。

【0224】

多数の適用において、PEG分子が単官能性である（または単活性化される）ように、1つの末端上のPEG分子を本質的に非反応性部分でキャッピングすることが望ましい。概して、活性化PEGに対して複数の反応部位を示すタンパク質治療の場合、同一二官能性活性化PEGは、大規模な架橋結合をもたらし、官能性に乏しい凝集体を産出する。単活性化PEGを生成するために、PEGジオール分子の末端上の1つのヒドロキシル部分は

、典型的には、非反応性メトキシ末端部分、 $-OCH_3$ で置換される。この実施形態において、ポリマーを、 $MeO-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$ で表すことができ、一般的に「mPEG」と称され、式中、nは、典型的には4～10,000に及ぶ。

【0225】

他方のPEG分子のキャッピングされていない末端は、典型的には、表面上の反応部位またはタンパク質、ペプチド、もしくはオリゴヌクレオチド等の分子での結合のために活性化することができる反応末端部分に変換される。

【0226】

いくつかの事例において、異なる二官能性PEG試薬を生成することが望ましく、PEG分子の末端がN-ヒドロキシスクシンイミドまたはニトロフェニルカーボネート等の反応基を有する一方で、反対側の末端は、マレイミドまたは他の活性化基を含有する。これらの実施形態において、2つの異なる官能性、例えば、アミンおよびチオールを、異なる時期に活性化PEG試薬に共役することができる。

【0227】

医薬組成物

本発明は、TFPIに結合するアプタマーを含む医薬組成物も含む。いくつかの実施形態において、組成物は、単独で、もしくは1つ以上の薬学的に許容される担体または希釈剤との組み合わせで、治療有効量の薬理的に活性なTFPIアプタマーまたはその薬学的に許容される塩を含む。

【0228】

組成物は、1つ以上のTFPIアプタマーを含み得る。例えば、組成物は、ARC19499を含み得る。あるいは、組成物は、ARC19882を含み得る。あるいは、組成物は、ARC19499および別のTFPIアプタマーを含み得る。組成物が同一のアプタマーであるか、あるいは2つの異なるアプタマーであり得る少なくとも2つのアプタマーを含む実施形態において、アプタマーを、任意でともに繋留するか、またはさなければカップリングすることができる。好ましくは、組成物は、ARC19499単独、または別のTFPIアプタマーと組み合わせたARC19499のいずれかを含む。あるいは、組成物は、別の作用物質と組み合わせたTFPIアプタマーを含む。好ましくは、組成物は、別の作用物質と組み合わせたARC19499を含む。

【0229】

本明細書で使用される「薬学的に許容される塩」という用語は、使用条件下で非毒性である対イオンで調製され、安定した製剤と互換性がある活性化合物の塩形態を指す。TFPIアプタマーの薬学的に許容される塩の例として、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、および酒石酸塩が挙げられる。

【0230】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」、「薬学的に許容される媒体」、または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、製剤の他の成分と互換性があり、そのレシピエントに対して有害ではないことを意味する。薬学的に許容される担体は、当技術分野で周知である。薬学的に許容される担体の例を、例えば、Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, latest editionで見出すことができる。

【0231】

医薬組成物は、概して、本治療における治療有効量の活性構成要素、例えば、薬学的に許容される担体または媒体中に溶解もしくは分散される本発明のTFPIアプタマーを含む。好ましい薬学的に許容される担体の例として、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、およびグルコース溶液が挙げられるが、それらに限定されない。しかしながら、他の薬学的に許容される担体も使用し得ることが企図される。他の薬学的に許容される媒体または担体の例として、任意および全ての溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌剤、抗真菌剤、等張遅延剤、および吸収遅延剤等が挙げられる。組成物中で用いることができる薬学的に許容される

担体には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミン等の血清タンパク質、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム等の緩衝物質、飽和脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、硫酸プロタミン、リン酸1水素2ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム等の塩または電解質、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸塩、ワックス、ポリエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂が含まれるが、それらに限定されない。薬学的に活性な物質へのそのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において周知である。

【0232】

医薬組成物は、製剤のpH、オスモル濃度、粘度、透明度、色、無菌性、安定性、分解または吸収率を改変または維持するための保存剤、安定剤、湿潤剤、もしくは乳化剤等の薬学的に許容される賦形剤、溶液促進剤、塩、または緩衝液も含有し得る。固体組成物に関して、賦形剤は、医薬品等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、滑石、セルロース、グルコース、サッカロース、炭酸マグネシウム等を含む。

【0233】

医薬組成物は、従来の混合法、造粒法、コーティング法に従って調製され、典型的には、活性構成要素の0.1%~99.9%、例えば、0.1%~75%、0.1%~50%、0.1%~25%、0.1%~10%、0.1~5%、好ましくは1%~50%を含有する。

【0234】

医薬組成物の製剤は当業者に既知である。典型的には、そのような組成物を、液体溶液もしくは懸濁液のいずれかの注入物質、注入前の液体中の溶液もしくは懸濁液に好適な固体形態、経口投与用の錠剤または他の固体、徐放性製剤用の徐放性カプセル、あるいは点眼薬、クリーム、ローション、軟膏、吸入薬等を含む現在使用されている任意の他の形態に製剤化することができる。本組成物を、例えば、担体としてポリアルキレングリコールを用いて、坐薬に製剤化することができる。いくつかの実施形態において、坐薬は、脂肪乳剤または懸濁液から調製される。手術野における特定の領域を治療するための外科医、医師、または医療従事者による生理食塩水ベースの洗浄液等の無菌製剤の使用は、特に有用であり得る。

【0235】

本組成物を、錠剤、カプセル、丸剤、粉末、顆粒、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁液、シロップ、および乳剤等の経口剤形に製剤化することができる。例えば、錠剤またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態での経口投与に関して、活性薬物成分を、エタノール、グリセロール、水等の薬学的に許容される経口用非毒性担体と合わせることができる。さらに、所望されるか、あるいは必要である場合、好適な結合剤、滑剤、崩壊剤、および着色剤を混合物に組み込むこともできる。好適な結合剤には、デンプン、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプン糊、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシルメチルセルロースナトリウムおよび／またはポリビニルピロリドン、グルコースもしくはベータラクトース等の天然糖、コーンシロップ、アカシア、トラガカント、もしくはアルギン酸ナトリウム等の天然および合成粘剤、ポリエチレングリコール、ワックス等が含まれる。これらの剤形に使用される滑剤には、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、シリカ、滑石、ステアリン酸、そのマグネシウムもしくはカルシウム塩、および／またはポリエチレングリコール等が含まれる。崩壊薬には、制限なく、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタンガムデンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、または発泡性混合物等が含まれる。希釈剤には、例えば、ラクトース、ブドウ糖、サッカロース、マニトール、ソルビトール、セルロース、および／またはグリシンが含まれる。

10

20

30

40

50

【0236】

医薬組成物を、小単層ベシクル、大単層ベシクル、および多層ベシクル等のリポソーム送達システムにおいて製剤化することもできる。リポソームを、コレステロール、ステアリルアミン、またはホスファチジルコリンを含有する多種多様のリン脂質から形成することができる。いくつかの実施形態において、脂質成分の膜は、米国特許第5,262,564号に説明されるように、薬物の水溶液で水和されて、薬物をカプセル化する脂質層を形成する。例えば、本明細書に記載のアプタマーを、当技術分野で既知の方法を用いて構築される脂溶性化合物または高分子量の非免疫原性化合物との複合体として得ることができる。さらに、リポソームは、細胞毒性薬を内部で標的化および運搬して細胞死滅を媒介するために、それらの表面上にアプタマーを担持し得る。核酸に関連する複合体の例は、米国特許第6,011,020号に提供される。

10

【0237】

本発明の組成物を、標的化可能な薬物担体として可溶性ポリマーとカップリングさせることができる。そのようなポリマーは、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミドフェノール、ポリヒドロキシエチルアスパナミドフェノール、またはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリジンを含み得る。さらに、本発明の組成物を、薬物の制御放出を達成するのに有用な生分解性ポリマーのクラス、例えば、ポリ乳酸、ポリε-プロピオンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート、およびヒドロゲルの架橋または両親媒性ブロックコポリマーにカップリングさせることができる。

20

【0238】

本発明の組成物を、医療デバイスとの併用で使用することもできる。

【0239】

投与される活性成分の量および組成物の容量は、治療される宿主動物によって決まる。投与に必要とされる正確な量の活性化合物は、施術者の判断によって決まり、それぞれの個人に特有である。

【0240】

活性化合物を分散するのに必要とされる最小容量の組成物が、典型的には利用される。好適な投与計画を変えることもできるが、初めに化合物を投与し、結果を監視し、次いでさらに制御された用量をさらなる間隔で与えるのが特徴であろう。

30

【0241】

投与

本組成物を、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、およびより好ましくはヒトに投与することができる。「患者」および「対象」という用語は、本出願を通して同義に使用され、これらの用語は、ヒトおよび動物対象の両方を含む。

【0242】

T F P I アプタマーがアンタゴニストアプタマーである実施形態において、本明細書で提供されるT F P I アプタマー組成物は、T F P I によって媒介される血液凝固の障害を障害するか、軽減するか、阻止するか、またはさもなければ調節するのに有効な量で対象に投与される。T F P I アプタマー組成物は、T F P I によって媒介される血液凝固の障害を、完全にもしくは部分的に障害するか、軽減するか、阻止するか、またはさもなければ調節し得る。T F P I アプタマーは、少なくとも1~2%の因子補充と同等である血友病血漿に対して、そのアプタマーが、トロンビン生成の増加（例えば、ピークトロンビン、内因性トロンビン生成能、または遅延時間）を引き起こす時に、T F P I 活性を障害するか、またはさもなければ調節すると見なされる。

40

【0243】

本組成物を、多数の投与経路で投与することができる。そのような投与経路には、経口経路、経鼻的、経腔的、または経直腸的等の局所経路、ならびに静脈、皮下、皮内、筋肉内、関節内、および髄腔内投与等の非経口経路が含まれるが、それらに限定されない。好適

50

な投与経路を、静脈内投与後の皮下投与等の組み合わせで用いることもできる。しかしながら、投与経路は、担当医により決定される。好ましくは、製剤は、静脈投与される。最も好ましくは、製剤は、皮下投与される。

【0244】

経口剤形を、錠剤、カプセル、丸剤、粉末、顆粒、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁液、シロップ、または乳剤として投与することができる。

【0245】

局所剤形には、クリーム、軟膏、ローション、経鼻媒体用のエアゾールスプレーおよびゲル、吸入薬、または経皮貼布が含まれる。

【0246】

非経口剤形には、予充填シリンジ、ならびに前投与に再構成される溶液および凍結乾燥粉末が含まれる。

【0247】

本発明のアプタマーを利用する用法用量は、患者の種類、種、年齢、体重、性別、および病状を含む多種多様の要因、治療される状態の重症度、投与経路、患者の腎機能および肝機能、ならびに採用される特定のアプタマーまたはその塩に従って選択される。当業医師または獣医は、状態の進行を予防するか、それに対抗するか、あるいは停止させるのに必要とされる薬物の有効量を容易に決定および処方することができる。

【0248】

医薬組成物を、様々な治療計画を用いて投与することができる。例えば、本組成物を、患者が出血症状に罹患していない時等に、維持療法として、規定された用量で規定された期間投与することができる。あるいは、本組成物を、患者が出血症状に罹患している時等に、要望に応じて、すなわち、必要に応じて投与することができる。さらなる代替実施形態において、本組成物を、維持療法および要望に応じた療法の組み合わせで投与することができる。そのような実施形態において、組成物を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、組成物の投与量を出血が止まるまで必要に応じて増加させ、その時点で、組成物の投与量を以前の維持レベルに減少させて戻す。別のそのような実施形態において、組成物を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、別の出血障害の療法（第V I I I因子等）を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、他の出血障害療法が打ち切られる。この全期間中、組成物を維持療法として投与し続ける。さらに別のそのような実施形態において、組成物を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、組成物の投与量を減少させ、別の出血障害療法（第V I I I因子等）を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、組成物の投与量を以前の維持レベルまで増加させて戻し、他の出血障害療法が打ち切られる。別のそのような実施形態において、別の出血障害療法（第V I I I因子等）を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間を投与することができ、その場合、組成物を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、組成物での治療が打ち切られる。この全期間中、他の出血障害療法を維持療法として投与し続ける。さらに別のそのような実施形態において、別の出血障害療法（F V I I I等）を、出血が起こるまで、維持療法として規定された用量で規定された期間投与することができ、その場合、他の出血障害療法の投与量を減少させ、組成物を出血が止まるまで患者に投与し、その時点で、他の出血障害療法の投与量を以前の維持レベルに増加させて戻し、組成物での療法が打ち切られる。

【0249】

適応症

本組成物は、TFPIによって媒介される血液凝固の阻害を伴う出血障害の病状の治療を含む、組織因子経路阻害剤（TFPI）によって媒介される病状を治療するか、予防するか、その進行を遅延させるか、あるいは改善するために使用される。治療されるか、予防されるか、遅延されるか、あるいは改善される病状は、血友病A（第V I I I因子欠乏症

10

20

30

40

50

）、血友病 B（第 I X 因子欠乏症）、および血友病 C（第 X I 因子欠乏症）を含む、軽度もしくは中程度もしくは重度の先天性または後天性凝固因子欠乏症、阻害剤を有する血友病 A もしくは B、他の因子の欠乏症（V、V I I、X、X I I I、プロトロンビン、フィブリノーゲン）、 $\alpha 2$ プラスミン阻害剤の欠乏、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 1 の欠乏、複数の因子欠乏、機能的因子異常（例えば、プロトロンビン異常）、足首、肘、および膝を含むが、それらに限定されない関節出血（関節血症）、他の位置（筋肉、胃腸、口等）における特発性出血、出血性卒中、頭蓋内出血、外傷に関連する裂傷および他の出血、急性外傷性凝固障害、癌（例えば、急性前骨髄球性白血病）に関連する凝固障害、フォンビルブランド病、播種性血管内凝固、肝臓疾患、月経過多、血小板減少、ならびに抗凝固剤の使用に関連する出血（例えば、ビタミン K 拮抗薬、F X a 拮抗薬等）からなる群から選択される。

10

【0250】

医薬組成物を、医学的手技の前、間、および／または後に投与することもできる。例えば、医薬組成物を、歯科処置、関節形成術（例えば、人工股関節置換手術）を含むが、それらに限定されない整形外科、外科的または放射性滑膜切除術（R S V）、大手術、静脈穿刺、輸血、および切断術により引き起こされる出血に関連した予防法および／または治療等の医学的手技（前、間、および／もしくは後）と併せて投与することができる。

【0251】

治療上の論理的根拠

作用機序に関する理論に束縛されることを望むことなく、以下の治療上の論理的根拠が、ほんの一例として提供される。

20

【0252】

組織因子経路阻害剤（T F P I）の阻害剤は、（外因経路としても既知の）組織因子／第 V I I a 因子経路を介してトロンビンの生成を高めることが予想されるであろう。正常な個人において、外因経路の活性化は、トロンビン生成応答を刺激して開始させ、少量の活性化トロンビンをもたらす。開始後、この経路は、T F P I の阻害作用により急速に非活性化される。その後のトロンビン生成応答の増殖は、第 V I I I 因子（F V I I I）および第 I X 因子（F I X）を含む内在経路のトロンビン媒介性フィードバック活性化によって決まる。増殖は、十分に多くの量のトロンビンを生成し、安定した血餅の形成を触媒するのに必要である。第 V I I I 因子（血友病 A）または第 I X 因子（血友病 B）のいずれかを欠乏する個人は、低下した増殖応答を有する。重度の欠乏（1 % 未満）を有する個人は、内在経路を介してこれらのタンパク質に依存しているトロンビンを生成することができない。この状態は、十分なトロンビンを生成し、適切な血小板活性化、フィブリン生成、および安定した血栓形成を有することができなくする。しかしながら、これらの個人は、無傷の外因経路を有する。T F P I の阻害は、開始応答の継続を許容し、増殖が外因経路を介して起こることを可能にし、十分なトロンビン生成を許容して、欠乏した内在経路を部分的または完全に置換し、ゆえに出血危険性を軽減し得る。出血増加の危険性も有するこれらの因子を軽度または中程度に欠乏する個人は、T F P I 阻害により引き起こされる血液凝固の増加から恩恵を受ける場合もある。加えて、外傷等の他の理由で出血している正常な内因および外因経路を有する患者において、T F P I 阻害は、出血を制御し得る止血刺激を提供することができる。他の凝固因子の欠乏、血小板欠乏、および出血に関連する血管障害を有する患者は、T F P I を阻害するであろう治療から恩恵を受ける場合もある。

30

40

【0253】

併用療法

本発明の一実施形態は、凝固カスケード調節分子の他の凝固促進因子または他の阻害剤等の出血性疾患もしくは障害の 1 つ以上の他の治療との併用で使用され、る T F P I アプタマーもしくはその塩または医薬組成物を含む。医薬組成物を、活性化プロトロンビン複合体濃縮製剤（A P C C）、第 V I I I 因子インヒビターバイパス複合体製剤（F E I B A（登録商標））、組換え第 V I I a 因子（例えば、N o v o S e v e n（登録商標））、

50

組換え第V I I I因子（Advate（登録商標）、Kogenate（登録商標）、Recombinate（登録商標）、Helixate（登録商標）、ReFacto（登録商標））、血漿由来第V I I I因子（Humate P（登録商標）、Hemofil M（登録商標））、組換え第I X因子（BeneFIX（登録商標））、血漿由来第I X因子（Bebulin VH（登録商標）、Konynne（登録商標）、Mononine（登録商標））、寒冷沈降物、酢酸デスマプレシン（DDAVP）、イブシロンアミノカプロン酸、またはトラネキサム酸等の別の薬物との併用で投与することもできる。あるいは、医薬組成物を、血液もしくは血液製剤の輸血、血漿フェレーシス、高用量の置換因子での免疫寛容導入療法、免疫抑制剤（例えば、プレドニゾン、リツキシマブ）での免疫寛容療法、または疼痛治療等の別の療法との併用で投与することができる。概して、既知の治療薬の現在利用可能な剤形およびそのような組み合わせで用いる非薬物療法の使用が好適である。

10

【0254】

「併用療法」（または「共治療」）は、TFPIアプタマー、およびこれらの治療薬もしくは治療の共作用から有益な効果を提供するよう意図される特定の治療計画の一環として少なくとも第2の作用物質または治療の投与を含む。併用療法の有益な効果には、治療薬または治療の併用に由来する薬物動態学的もしくは薬力学的共作用が含まれるが、それらに限定されない。併用療法におけるこれらの治療薬または治療の投与は、典型的には、規定された期間（選択される併用に応じて、通常、数分、数時間、数日間、または数週間）にわたって実行される。

20

【0255】

併用療法は、本発明の併用を付随的および任意にもたらす別個の単剤治療計画の一環として、これらの治療薬または治療のうちの2つ以上の投与を包含するよう意図される場合もあるが、一般的には意図されない。併用療法は、順次様式で治療薬または治療の投与を包含するよう意図される。すなわち、これらの治療薬もしくは治療の投与、または治療薬もしくは治療のうちの少なくとも2つの投与と同様に、それぞれの治療薬もしくは治療は、実質的に同時に起こる様式で異なる時間に投与される。実質上同時投与を、例えば、対象に、各治療薬の一定した比率を有する単回注入薬、または治療薬のそれぞれの複数回の単回注入薬を投与することにより達成することができる。

【0256】

各治療薬または治療の順次投与または実質上同時投与を、局所経路、経口経路、静脈経路、皮下経路、筋肉内経路、および粘膜組織を通る直接吸収を含むが、それらに限定されない任意の適切な経路により達成することができる。治療薬もしくは治療を、同一の経路または異なる経路で投与することができる。例えば、選択される併用療法の第1の治療薬または治療を、注入により投与することができる一方で、併用療法の他の治療薬または治療を、皮下投与することができる。あるいは、例えば、全ての治療薬または治療を、皮下投与することができるか、あるいは全ての治療薬または治療を、注入により投与することができる。治療薬または治療が投与される順序は、別途留意されない限り重要ではない。

30

【0257】

併用療法は、他の生物学的に活性な成分とのさらなる併用で、上述の治療薬または治療の投与を包含することもできる。併用療法が非薬物療法を含む場合、治療薬および非薬物療法の併用の共作用から有益な効果が得られる限り、その非薬物療法を、任意の好適な時間で行うことができる。例えば、適切な場合において、非薬物療法が、恐らく数日あるいは数週間、治療薬の投与から時間的に除去される場合にも依然として有益な効果が得られる。

40

【0258】

拮抗薬

本発明はさらに、本明細書で「TFPI拮抗薬」と称される、TFPIアプタマーの影響を逆転させる作用物質に関する。本作用物質は、タンパク質、抗体、小分子有機化合物、またはオリゴヌクレオチド等の任意の種類の分子であり得る。

50

【0259】

好ましくは、TFPI拮抗薬は、10～15個のヌクレオチド長の核酸である。しかしながら、拮抗薬の長さには制限はない。

【0260】

好ましくは、TFPI拮抗薬は、TFPIアプタマーに結合する。TFPI拮抗薬は、全長TFPIアプタマーまたはその画分に結合し得る。そのような結合は、イオン相互作用、共有結合、相補的塩基対合、水素結合、または任意の他の種類の化学結合を介し得る。好ましくは、そのような結合は、相補的塩基対合を介する。理論に束縛されることを望むことなく、TFPI拮抗薬は、TFPIアプタマーとのハイブリッド形成により作用し、それにより、TFPIアプタマーの二次および三次構造を破壊し、TFPIへのTFPIアプタマーの結合を予防する。TFPIへのTFPIアプタマーの結合を予防することにより、結合相互作用の効果、例えば、治療効果、および／または分子経路の刺激もしくは阻害を調節することができ、結合相互作用および関連する影響の程度を制御する手段を提供する。

10

【0261】

TFPI拮抗薬は、リボ核酸、デオキシリボ核酸、またはリボ核酸およびデオキシリボ核酸の混合物であり得る。好ましくは、TFPI拮抗薬は、単鎖である。好ましくは、TFPI拮抗薬は、全ての2'-Oメチル残基および3'-逆位のデオキシチミジンを含む。しかしながら、TFPI拮抗薬は、アプタマー上で見出すことができる任意の他の3'もしくは5'修飾とともに、修飾されたか、あるいは修飾されていない任意のヌクレオチド

20

【0262】

TFPI拮抗薬の例として、ARC23085である配列番号16、ARC23087である配列番号15、ARC23088である配列番号17、およびARC23089である配列番号18が挙げられるが、それらに限定されない。

【0263】

好ましくは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mA-mG-mC-mC-mA-mA-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mU-mC-mC（配列番号15）を含む核酸であり、式中、「mN」は、（当技術分野において2'-OMe、2'-メトキシ、または2'-OCH₃含有残基としても既知の）2'-Oメチル含有残基である。

30

【0264】

あるいは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mU-mA-mU-mA-mU-mA-mC-mG-mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA（配列番号16）を含む核酸であり、式中、「mN」は、2'-Oメチル含有残基である。

【0265】

あるいは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC（配列番号17）を含む核酸であり、式中、「mN」は、2'-Oメチル含有残基である。

40

【0266】

あるいは、TFPI拮抗薬は、以下に示される構造：

mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC-mA-mA（配列番号18）を含む核酸であり、式中、「mN」は、2'-Oメチル含有残基である。

【0267】

ARC23085の化学名は、2'-OMe-アデニル-（3'→5'）-2'-OMe-グアニル-（3'→5'）-2'-OMe-シチジル-（3'→5'）-2'-OMe-シチジル-（3'→5'）-2'-OMe-アデニル-（3'→5'）-2'-OMe-アデニル-（3'→5'）-2'-OMe-グアニル-（3'→5'）

50

－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリルである。

【0268】

ARC23087の化学名は、2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－グアニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルルである。

10

【0269】

ARC23088の化学名は、2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－グアニルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－グアニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリルである。

20

【0270】

ARC23089の化学名は、2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－ウラシルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－グアニルル－(3'→5')－2'－OMe－グアニルル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－シチジリル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルル－(3'→5')－2'－OMe－アデニルルである。

30

【0271】

本発明は、配列番号15、16、17、または18のうちのいずれか1つに対して70%以上の同一性を有するTFPI拮抗薬も含む。例えば、TFPI拮抗薬は、配列番号15、16、17、または18のうちの1つに対して70、75、80、85、90、95、または100%の同一性を有し得る。

【0272】

本発明は、TFPIアプタマーに結合するTFPI拮抗薬を含有する医薬組成物も含む。いくつかの実施形態において、本組成物は、単独で、または1つ以上の薬学的に許容される担体との組み合わせで、有効量の薬理的に活性TFPI拮抗薬またはその薬学的に許容される塩を含む。本組成物は、1つ以上の異なるTFPI拮抗薬を含有し得る。TFPI拮抗薬は、TFPIアプタマーの治療効果を逆転させるのに有効な量で対象に投与される。本組成物を、例えば、局所的、経鼻的、または非経口的等の多数の投与経路により投与することができる。TFPI拮抗薬の用法用量は、患者の種類、種、年齢、体重、性別、および病状を含む多種多様の要因、治療される状態の重症度、投与経路、患者の腎機能および肝機能、患者を治療するのに用いられるTFPIアプタマーの量、ならびに採用される特定のTFPI拮抗薬またはその塩によって決まる。当業医師または獣医は、TFPIアプタマーの治療効果を逆転させるのに必要とされるTFPI拮抗薬の有効量を容易に決定および処方することができる。

40

50

【0273】

本発明はさらに、TFPIアプタマーの止血活性を中和させる作用物質を含む。そのような作用物質は、TFPIに結合し、そのTFPIアプタマーによる阻害を予防し得るか、あるいは作用物質は、TFPIアプタマーの止血活性に対応する様式で、下流の凝固因子（例えば、FXaまたはトロンビン）を阻害し得る。そのような作用物質は、未分画ヘパリンまたは低分子量ヘパリン等の抗凝固剤を含み得るが、それらに限定されない。Wesselschmidtによる研究（Wesselschmidt et al., “Structural requirements for tissue factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin”, Blood Coagul Fibrinolysis, vol. 4, pp. 661-669 (1993)）は、ヘパリンが、K3およびC末端ドメインとの相互作用を介してTFPIに結合し、TFPIに結合するTFPIアプタマーの能力を直接的または間接的のいずれかで妨害し得ることを示す。さらに、同一の研究において、ヘパリン結合は、TFPIのFXa阻害活性を促進し、TFPIアプタマーの止血活性にさらに対抗する傾向があることが観察された。最終的に、ヘパリンは、抗トロンビン依存的機構を介してトロンビン、Fxa、および他の凝固因子を阻害することで周知である。これらの活性は、トロンビン生成および血栓形成を刺激するTFPIアプタマーの能力を中和させる場合もある。TFPIアプタマーの止血効果が血栓症を引き起こす事象において、これらの作用物質のうちの1つを投与して、その進行を停止させることができる。当業医師もしくは獣医は、TFPIアプタマーの止血効果を逆転させるのに必要とされる抗凝固または他の中和剤の有効量を容易に決定および処方することができる。

【0274】

キット

医薬組成物を、キット内に包装することもできる。本キットは、TFPIアプタマーの投与に関する取扱説明書とともに組成物を含む。本キットは、以下：シリンジもしくは予充填黒シリンジ、点滴用袋もしくは瓶、バイアル、異なる剤形の同一のTFPIアプタマー、または別のTFPIアプタマーのうちの1つ以上も含み得る。例えば、本キットは、本発明のTFPIアプタマーの静脈内投与製剤および皮下投与製剤の両方を含み得る。あるいは、本キットは、凍結乾燥したTFPIアプタマーおよび生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水の点滴用袋を含み得る。本キットの形態は、別個の成分が異なる剤形で投与される（すなわち、非経口および経口）はずである時、または異なる投与間隔で投与される時に、特に有益である。本キットはさらに、拮抗薬の投与に関する取扱説明書とともにTFPI拮抗薬を含み得る。本キットは、TFPI拮抗薬の静脈内投与製剤および皮下投与製剤の両方を含み得る。あるいは、本キットは、凍結乾燥したTFPI拮抗薬および溶液の点滴用袋を含み得る。

【0275】

好ましくは、キットは、 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で保存される。本キットは、室温で保存するか、あるいは -20°C で凍結することができる。

【0276】

TFPIの調節

本発明は、分子がTFPIの1つ以上の部分に結合するか、またはさもないければそれと相互作用する、TFPIを調節するための方法も提供し、少なくとも一部は、K3/C末端領域等のTFPIのK1およびK2ドメインの外側である。分子は、例えば、小分子有機化合物、抗体、タンパク質もしくはペプチド、核酸、siRNA、アプタマー、またはそれらの任意の組み合わせ等の任意の種類の分子であり得る。好ましくは、分子は、小分子有機化合物である。より好ましくは、分子は、抗体である。最も好ましくは、分子は、アプタマーである。例えば、分子は、TFPIの直線部分または等角部分に結合するか、あるいはさもないければそれと相互作用し得る。分子が、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基の連続的ストレッチに結合するか、あるいはさもないければそれと相互作用する時

に、その分子は、TFPIの直線部分に結合するか、あるいはさもないければそれと相互作用する。分子が、ポリペプチド鎖の二次および／または三次構造を折り畳むことにより、またはそれらの他の態様によりまとめられる非連続的なアミノ酸残基に結合するか、あるいはさもないければそれと相互作用する時に、その分子は、TFPIの等角部分に結合するか、あるいはさもないければそれと相互作用する。好ましくは、分子は、アミノ酸148～170、アミノ酸150～170、アミノ酸155～175、アミノ酸160～180、アミノ酸165～185、アミノ酸170～190、アミノ酸175～195、アミノ酸180～200、アミノ酸185～205、アミノ酸190～210、アミノ酸195～215、アミノ酸200～220、アミノ酸205～225、アミノ酸210～230、アミノ酸215～235、アミノ酸220～240、アミノ酸225～245、アミノ酸230～250、アミノ酸235～255、アミノ酸240～260、アミノ酸245～265、アミノ酸250～270、アミノ酸255～275、アミノ酸260～276、アミノ酸148～175、アミノ酸150～175、アミノ酸150～180、アミノ酸150～185、アミノ酸150～190、アミノ酸150～195、アミノ酸150～200、アミノ酸150～205、アミノ酸150～210、アミノ酸150～215、アミノ酸150～220、アミノ酸150～225、アミノ酸150～230、アミノ酸150～235、アミノ酸150～240、アミノ酸150～245、アミノ酸150～250、アミノ酸150～255、アミノ酸150～260、アミノ酸150～265、アミノ酸150～270、アミノ酸150～275、アミノ酸150～276、アミノ酸190～240、アミノ酸190～276、アミノ酸240～276、アミノ酸242～276、アミノ酸161～181、アミノ酸162～181、アミノ酸182～240、アミノ酸182～241、およびアミノ酸182～276からなる群から選択される成熟TFPI（例えば、図3A）の1つ以上の部分に少なくともある程度結合する。分子は、好ましくは、100 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、100 nM未満、好ましくは50 nM以下、好ましくは25 nM以下、好ましくは10 nM以下、好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、さらにより好ましくは1 nM以下、および最も好ましくは500 pM以下のヒトTFPIまたはその変形に対する解離定数を含む。

【0277】

その精神および範囲から逸脱することなく、当業者に明らかであるように、本発明において多数の修正および変形が行うことができる。本明細書に記載の特定の実施形態は、ほんの一例として提供されており、本発明は、そのような特許請求の範囲が付与される同等物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ制限される。

【0278】

本明細書で引用される全ての出版物および特許文書は、そのような出版物および文書それぞれが、参照により本明細書に組み込まれることを具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。出版物および特許文書の引用は、いずれも関連のある先行技術であると認めるものではなく、その内容または日付に関して承認するものでもない。本発明を画面による記述で説明してきたが、当業者は、本発明を多種多様な実施形態において実践することができ、前述の説明および以下の実施例は、図解目的であって、以下に続く特許請求の範囲を制限しないことを認識する。

【実施例】

【0279】

実施例において、以下のTFPIアダプターのうちの1つ以上を用いて、様々な実験を行った。ARC26835は、配列番号1に説明されるアダプターである。ARC17480は、配列番号2に説明されるアダプターである。ARC19498は、配列番号3に説明されるアダプターである。ARC19499は、配列番号4に説明されるアダプターである。ARC19500は、配列番号5に説明されるアダプターである。ARC19501は、配列番号6に説明されるアダプターである。ARC26835は、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC19500、およびARC19501のそれぞれのコアアダプター配列である。ARC31301は、配列番号7に説明される

アダプターである。ARC18546は、配列番号8に説明されるアダプターである。ARC19881は、配列番号9に説明されるアダプターである。ARC19882は、配列番号10に説明されるアダプターである。ARC31301は、ARC18546、ARC19881、およびARC19882のそれぞれのコアアダプター配列である。

【0280】

実施例1

本実施例は、どのようにARC19499が生成されたかを実証する。

【0281】

インビトロ選択実験を、それぞれ、dC、mA、mG、およびmU残基を含有した修飾オリゴヌクレオチド分子のプール、ならびにAmerican Diagnostica (カタログ番号4500PC、Stamford, CT) から入手した組換えヒト組織因子経路阻害剤 (TFPI) を用いて実行した。TFPIに結合するための選択の反復ラウンド、続いて増幅ラウンドを実行して、ARC14943、ARC19499への84個のヌクレオチド長の前駆物質を生成した。ARC14943を、コンピュータによる折り畳み予測プログラムおよび系統的欠失を用いて84個のヌクレオチドから32個のヌクレオチド (ARC26835) に最小化した。ARC26835への3'-逆位のデオキシチミジン残基の付加は、ARC17480、33個のヌクレオチド長分子をもたらした。ARC17480への5'-ヘキシルアミン基の添加は、ARC19498をもたらした。次に、この分子を、5'-ヘキシルアミン基を介して40kDa PEG部分でPEG化して、ARC19499をもたらした。

【0282】

実施例2

本実施例は、ARC17480が、競合tRNAの不在および存在下の両方で、ドットプロット結合実験においてインビトロでTFPIに密接に結合することを実証する。

【0283】

放射標識したARC17480を、異なる濃度のTFPIとともにインキュベートした。次に、TFPIに結合したARC17480を、ニトロセルロースフィルター膜上に捕捉した。添加した全体の放射標識したARC17480に対するニトロセルロースフィルターに結合した放射標識したARC17480の比率を、タンパク質濃度の関数としての結合したARC17480の割合として決定し、プロットした。ARC17480/TFPI結合プロットの例が図12Aに示される。データを、単相および二相アダプタータンパク質結合のモデルに当てはめた。この実験を11回繰り返し、単相および二相結合モデルの両方を用いて K_D を各データセットについて決定した。単相適合を用いて決定された平均 K_D は 4.0 ± 1.5 nMであり、二相適合を用いて決定された平均 K_D は 1.7 ± 0.7 nMであった。それら自体への適合およびそれら自体の適合は、いずれの結合モデルも明確に支持しないが、データへの単相適合および二相適合の両方ともに、TFPIへのARC17480の相互作用の異なるモデルを想定する。データに当てはめるために使用したモデルにかかわらず、TFPIへのARC17480の結合について決定された K_D は、本質的に同一であった。単相適用および二相適用の両方から決定された K_D を考慮に入れた場合、TFPIに結合するARC17480の平均 K_D は、 2.9 ± 1.6 nMであった。この平均 K_D は、ARC17480とTFPIとの間の結合相互作用の様式を想定せず、したがって、アダプターとタンパク質との間の結合相互作用の最もロバストな決定である。ARC17480がtRNAの存在下でヒトTFPIへの結合を維持し、このことは、結合が特異的であったことを示唆する。TFPIに対するARC17480の結合親和性の変化は、 42 ± 12 nMの平均 K_D を有する 0.1 mg/mL tRNAの存在下で観察された。tRNAの存在および不在下でのTFPIに結合するARC17480のプロット例が図12Bに示される。

【0284】

実施例3

本実施例は、非標識ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC2

6835、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882が、TFPIへの結合において、放射標識したARC17480と競合することを実証する。本実施例は、これらのアプタマーの全てがARC17480で観察された親和性に類似したTFPIの親和性を有することも実証する。

【0285】

各アプタマーを、結合競合アッセイにおいて、TFPIへの結合について評価した。これらの実験に関して、ヒトTFPI (American Diagnostica, Stamford, CT、カタログ番号4500PC)を、微量の放射標識したARC17480および異なる濃度の非標識競合アプタマー (ARC19499を除く全てのアプタマーにおいては5000nM~0.25nM、ARC19499においては1000nM~0.05nM)とともにインキュベートした。図13AのARC17480およびARC19499での実験において、60nM TFPIを用いた。全ての他の実験 (図13B~E)において、10nM TFPIを用いた。ARC17480を、対照として全ての実験で、競合相手として含めた。各アプタマーについて、各競合アプタマー濃度で結合した放射標識したARC17480の割合を分析に使用した。結合した放射標識したARC17480の割合をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (max / (1 + x / IC_{50})) + int$ (式中、 y = 結合した放射標識したARC17480の割合、 x = アプタマーの濃度、 max = 最大の結合した放射標識したARC17480、および $int = y$ 切片)に当てはめて、結合競合についての IC_{50} 値を生成した。図13A~Eは、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC26835、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882との競合実験のグラフを示す。これらの分子全てが、TFPIへの結合について、放射標識したARC17480と同様に競合した。これらの実験は、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC26835、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882の全てが、全長TFPIと同様に結合することを実証する。

【0286】

実施例 4

本実施例は、TFPIアプタマーがTFPIに特異的に結合することを実証する。

【0287】

本実験において、ARC17480を、凝固カスケードにおける鍵分子、すなわち、その阻害がTFPI阻害と同様の特性を示すであろう分子、または構造もしくは機能に関してTFPIと同様である分子である多種多様のタンパク質への結合について試験した。調査したタンパク質は、TFPI、第Va因子 (FVa)、第XI因子 (FXI)、抗トロンビン (ATII)、ヘパリン共同因子II (HCII)、アルファトロンビン、プロトロンビン、第VIIa因子 (FVIIa)、第IXa因子 (FIXa)、第Xa因子 (FXa)、第XIa因子 (FXIa)、カリクレイン、プラスミン、アルファ-1抗トリプシン (セルピン-A1)、TFPI-2、およびGST-TFPI-2であった。最大0.5~1μMの各タンパク質の存在下で、ARC17480は、試験した配列関連または機構関連のタンパク質に対して有意な親和性を有さなかった (図14A~D)。ARC17480は、タンパク質のより高い濃度であるFXIへの結合を示した。この結合が0.1mg/mL tRNAの存在下で除去され (図14D)、このことは、結合が恐らく非特異的であったことを示唆する。

【0288】

これらの実験は、TFPIアプタマーにより媒介される凝固への任意の影響が、恐らくTFPIの結合および阻害を指示するはずであることを示唆する。

【0289】

実施例 5

本実施例は、ARC19499がプレートベースの結合アッセイにおいてTFPIに密接に結合することを実証する。本実施例は、ARC19498が、プレートベースの結合アッセイにおいて、TFPIへの結合についてのARC19499との競合により、TFPIに密接に結合することも実証する。

【0290】

TFPIに対するARC19499の結合親和性を評価するために、組換えヒトTFPIタンパク質（0.5 mg/mL）を、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中に希釈して15 µg/mLの最終濃度にし、100 µLを96ウェルのMaxisorbプレートに添加し、4℃で終夜インキュベートした。次に、TFPI溶液を除去し、その後、プレートを室温にて200 µL洗浄緩衝液（DPBS+0.05% Tween 20）で3回洗浄した。次に、プレートを、室温で30分間、DPBS中の10 mg/mLウシ血清アルブミン（BSA）の200 µLでブロックした。次に、BSAブロッキング溶液を除去し、プレートを再度200 µL洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、DPBS中の0.1% BSAで連続して希釈したARC19499をプレートに添加し、室温で3時間インキュベートした。200 µL洗浄緩衝液で3回洗浄した後、0.5 µg/mLウサギモノクローナル抗PEG抗体（Epitomics）の100 µLをプレートに添加し、室温で60分間インキュベートした。次に、抗PEG抗体溶液を除去し、プレートを上述のように洗浄した。次いで、アッセイ緩衝液中で1000倍に希釈された100 µLの抗ウサギIgG-HRP二次抗体（Cell Signaling Technology）を各ウェルに添加し、30分間インキュベートした。200 µLの洗浄緩衝液で3回洗浄した後、100 µLの停止液（2N H₂SO₄）を各ウェルに添加して反応を停止させる前に、100 µLのTMB溶液（Pierce）を各ウェルに添加し、2分間インキュベートした。次に、アッセイプレートを、Victor³V 1420 マルチラベルカウンタ（Perkin Elmer）を用いて450 nmで読み取った。5つの異なる結合実験は、ARC19499と組換えTFPIとの間の結合親和性がプレートベースの結合アッセイにおいて30 nMであることを示唆した。これらの実験のうちの1つのデータが図15に示される。

【0291】

TFPIタンパク質に対するARC19498の親和性を評価するために、ARC19499：TFPI結合競合アッセイを設定した。組換えヒトTFPIタンパク質（0.5 mg/mL）をDPBS中に希釈して15 µg/mLの最終濃度にし、100 µLを96ウェルのMaxisorbプレートに添加し、4℃で終夜インキュベートした。次に、TFPI溶液を除去し、その後、プレートを室温にて200 µL洗浄緩衝液（DPBS+0.05% Tween 20）で3回洗浄した。次に、プレートを、室温で30分間、DPBS中の10 mg/mL BSAの200 µLでブロックした。次に、BSAブロッキング溶液を除去し、プレートを再度200 µL洗浄緩衝液で3回洗浄した。ARC19498を連続して希釈し、0.1% BSA中のDPBS中の20 nM ARC19499と異なる濃度で混合したARC19498：ARC19499混合物をプレートに添加し、室温で3時間インキュベートした。200 µL洗浄緩衝液で3回洗浄した後、0.5 µg/mLウサギモノクローナル抗PEG抗体（Epitomics）の100 µLをプレートに添加し、室温で60分間インキュベートした。次に、抗PEG抗体溶液を除去し、プレートを上述のように洗浄した。次いで、アッセイ緩衝液中で1000倍に希釈した100 µL抗ウサギIgG-HRP二次抗体（Cell Signaling Technology）を各ウェルに添加し、30分間インキュベートした。200 µL洗浄緩衝液で3回洗浄した後、100 µL停止液を各ウェルに添加して反応を停止させる前に、TMB溶液（Pierce）の100 µLを各ウェルに添加し、2分間インキュベートした。次に、アッセイプレートを、Victor³V 1420 マルチラベルカウンタ（Perkin Elmer）を用いて450 nmで読み取った。ARC19499結合の阻害の割合を、0%阻害として20 nM ARC19499中の0 nM ARC19498、ならびに100%阻害として0 nM ARC19498および0 nM ARC19499を用いて

計算した。IC₅₀を、Graphpad Prism 4ソフトウェアを用いて、4-パラメータロジスティックに基づいて計算した。図16は、本実験の2つの複製物を示し、それら両方ともに、本アッセイにおいて、ARC19499とのARC19498の競合についての20nMのIC₅₀をもたらした。これらの結果は、ARC19498が、プレートベースの結合アッセイにおいて、ARC19499で観察された結合親和性に類似したTFPIに対する結合親和性を有することを示唆する。

【0292】

実施例6

本実施例は、ARC17480が結合するTFPI上の領域を試験する。ドットプロット結合実験を、放射標識したARC17480および様々な切断型TFPIタンパク質で実行し、結合競合実験を、放射標識したARC17480、TFPI、およびヘパリンまたは低分子量ヘパリン(LMWH)で実行した。結合実験に用いたタンパク質は、以下の表1に記載される。

【0293】

微量の放射標識したARC17480を、異なる濃度(500nM~0.7nM)の全長TFPIおよびTFPI-Hisとともにインキュベートした(表1)。図17Aは、ARC17480が、全長TFPIへのその結合と比較して、TFPI-Hisへの結合を減少させたことを示す。本実験は、TFPI-His内で行方不明であるが、全長TFPI内では存在するTFPIのC末端20個のアミノ酸が、TFPIへのARC17480の結合に寄与することを示唆した。

【0294】

微量の放射標識したARC17480を、異なる濃度の切断型TFPI-K1K2(500nM~0.008nM)およびK3-C末端ドメインタンパク質(500nM~0.7nM)とともにインキュベートした(表1)。図17Bは、ARC17480が、切断型TFPI-K1K2への検出可能な結合を有さず、タンパク質のより高い濃度でのみ検出可能であったK3-C末端ドメインタンパク質への非常に弱い結合を有することを示す。微量の放射標識したARC17480を、異なる濃度のC末端ペプチド(10μM~0.17nM)とともにインキュベートした(表1)。次に、ニュートラアビジン(約100nMモノマー)を結合溶液に添加して、ニトロセルロースフィルター上でのアプタマー：ペプチド複合体の捕捉を支援した。ニトロセルロースフィルター上で捕捉された放射標識したアプタマーの量を定量化し、放射標識したアプタマーの総量と比較して、図17Bに示される結合曲線を生成した。ARC17480は、ペプチドの高い濃度でC末端ペプチドへの弱い結合を示した。

【0295】

微量の放射標識したARC17480を、0.1mg/mL未分画ヘパリンの不在または存在下で、異なる濃度の全長TFPI(500nM~0.008nM)とともにインキュベートした(図18A)。本結合実験でのヘパリンの包含は、TFPIへのARC17480結合を完全に無効にした。別個の実験において、微量の放射標識したARC17480を、12.5nM全長TFPIおよび未分画ヘパリンまたは低分子量ヘパリン(LMWH)の異なる濃度(5μM~0.25nM)とともにインキュベートした。図18Bは、未分画ヘパリンおよびLMWHの両方ともに、濃度依存的様式で、TFPIへの結合についてARC17480と競合したことを示す。ヘパリンは、LMWHよりも有効な競合相手であった。TFPIのK3-C末端領域は、グリコカリックス結合に関与しており、これは、ヘパリンおよびLMWHが結合されるはずのタンパク質の領域である。これらの実験は、TFPIのK3-C末端領域は、TFPIへのARC17480結合にとって重要であることを示唆する。

【0296】

総合すると、これらの実験は、C末端ドメインが恐らくTFPIへのARC17480結合に関与することを実証する。これらの実験は、TFPI上のARC17480結合領域が、タンパク質のK1~K2領域内またはタンパク質のK3-C末端領域内に完全に含有

されないことも実証する。A R C 1 7 4 8 0 結合に必要とされる領域は、恐らくタンパク質の2つ以上のドメインに及ぶ。

【表1】

表1：結合実験で使したタンパク質

タンパク質	記述	成熟 TFPI のアミノ酸
全長 TFPI	American Diagnostica、発現した大腸菌	1~276
TFPI-His	R&D Systems、発現したマウス骨髄腫細胞株	1~256+C 末端 10-His タグ
切断型 TFPI-K1K2	American Diagnostica、発現した大腸菌	1-161
K3-C 末端ドメイン	大腸菌	N 末端 6-His タグ+182~276
C 末端ペプチド	合成物質	N 末端ビオチン+242~276

【0297】

実施例7

本実施例は、A R C 1 7 4 8 0 および A R C 1 9 4 9 9 が結合する T F P I 上の領域を試験する。これらの実験について、T F P I 上の異なる領域に結合する抗体を用いて、プレートベースの結合アッセイにおいて、T F P I への結合について A R C 1 9 4 9 9 と競合させ、ドットプロット結合アッセイにおいて、T F P I への結合について A R C 1 7 4 8 0 と競合させた。競合に使用した抗体は、以下の表2に示される。

【0298】

本実施例は、抗体 A D 4 9 0 3 (A m e r i c a n D i a g n o s t i c a、カタログ番号4903)が、プレートベースの結合アッセイにおいて T F P I への A R C 1 9 4 9 9 の結合について競合し、ドットプロット結合アッセイにおいて T F P I への A R C 1 7 4 8 0 の結合について競合したことを実証する(図19Aおよび図20C)。抗体 A D 4 9 0 3 を、K 1 ドメインアミノ酸残基22~87を含有する T F P I の画分に対して産生させ、この領域のある場所で T F P I に結合させる(表2)。本実施例は、T F P I の K 2 ドメインと K 3 ドメインとの間の介在領域の一部であるアミノ酸残基148~162を含有したペプチドに対して産生させた抗体 A C J K - 4 が、ドットプロット結合アッセイにおいて、T F P I への結合について A R C 1 7 4 8 0 と弱々しく競合したことも実証する(図20B)。本実施例は、T F P I の C 末端ドメイン一部である、それぞれアミノ酸残基261~276および245~262を含有したペプチドに対して産生させた抗体 A C J K - 1 および A C J K - 2 が、プレートベースの結合アッセイにおいて、T F P I への A R C 1 9 4 9 9 結合について部分的に競合したことも実証する(図19B)。本実施例はさらに、T F P I の異なる領域に結合するいくつかの他の抗体が、プレートベースの結合アッセイにおいて、T F P I への結合について A R C 1 9 4 9 9 と競合せず、ドットプロットベースの結合アッセイにおいて、T F P I への結合について A R C 1 7 4 8 0 と競合しなかったことを実証する。競合実験で使した抗体は、以下の表2に示される。

【0299】

プレートベースの結合実験について、100 μL ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)中の T F P I (A m e r i c a n D i a g n o s t i c s、カタログ番号4900PC)の400 ng/ウェルを用いて、96ウェルの M a x i s o r b プレートに4℃で被覆した。次に、T F P I 溶液を除去し、その後、プレートを室温にて200 μL 洗浄緩衝液(DPBS+0.05% Tween 20)で3回洗浄した。次に、プレートを、室温で30分間、D P B S 中の10 mg/mL ウシ血清アルブミン(BSA)の200 μL

でブロックした。次に、BSAブロッキング溶液を除去し、プレートに200 μ L洗浄緩衝液で3回洗浄した。競合抗体を連続して希釈し、25 nM ARC19499の最終濃度のARC19499およびDPBS中の0.1%BSAと混合し、次に、混合物をアッセイプレートに添加し、室温で3時間インキュベートした。ARC19498を同様にARC19499と混合し、抗体競合アッセイで陽性対照として使用した。次に、ウェルを上述のように洗浄した。競合のための抗体AD4903、AD4904、および7035-A01を用いた実験について、アッセイ緩衝液中の0.5 μ g/mLウサギモノクローナル抗PEG抗体 (Epitomics、カタログ番号2061-1) の100 μ Lをプレートに添加し、室温で3時間インキュベートした。次に、抗PEG抗体溶液を除去し、プレートを上述のように洗浄し、その後、アッセイ緩衝液中の1:1000で希釈した抗ウサギIgG-HRP二次抗体 (Cell Signaling Technology、カタログ番号7074) の100 μ Lを各ウェルに添加し、30分間インキュベートした。二次抗体溶液を除去し、プレートを上述のように洗浄した。抗体ACJK1-ACJK5について、アッセイ緩衝液中の100 μ Lビオチン化ウサギモノクローナル抗PEG抗体 (Epitomics、カタログ番号2173) の0.5 μ g/mLをアッセイプレートに添加し、室温で3時間インキュベートし、その後、上述のように洗浄した。次に、抗体を除去し、プレートを上述のように洗浄し、その後、DPBS中で200倍に希釈されたR&D Systems (Minneapolis, MN) のストレプトアビジン-HRP (4800-30-06) の100 μ Lを添加し、室温でさらに1時間インキュベートした。次に、ストレプトアビジン-HRPを除去し、プレートを上述のように洗浄した。次に、TMB溶液 (Pierce、番号34028) の100 μ Lを各ウェルに添加し、2分間インキュベートし、その後、100 μ L停止液 (2N H₂SO₄) を各ウェルに添加して反応を停止させた。次に、アッセイプレートを、Victor³ V1420マルチラベルカウンター (Perkin Elmer) を用いて、450 nmで読み取った。結合阻害の割合を、0%阻害として25 nM ARC19499中の0 nM抗体、100%阻害として0 nM抗体および0 nM ARC19499を用いて計算した。IC₅₀を、Prism 4 Graphpadソフトウェアを用いて、4-パラメータロジスティックに基づいて計算した。

【0300】

図19Aに示されるように、TFPIのK1ドメイン内で結合する抗体AD4903は、プレートベースの結合アッセイにおいて、組換えTFPIへの結合についてARC19499と競合した。TFPIのC末端領域内で結合する抗体ACJK-1およびACJK-2は、プレートベースの結合アッセイにおいて、TFPIに結合するARC19499について部分的に競合した (図19B)。抗体AD4904、ACJK-3、ACJK-4、ACJK-5、および7035-A01は、プレートベースの結合アッセイにおいて、TFPIに結合するARC19499についての競合を示さなかった (図19AおよびB)。これらの実験は、TFPIのK1領域およびC末端領域が、TFPIに結合するARC19499に関与していることを示唆する。

【0301】

表2の抗体も、ドットプロットベースの競合結合アッセイにおいて試験した。これらの実験において、微量の放射標識したARC17480を、場合によっては抗体を添加して、10 nM組換えTFPIとともにインキュベートした。抗体を、1000 nM、333 nM、111 nM、37.0 nM、12.4 nM、4.12 nM、1.37 nM、0.46 nM、0.15 nM、および0.051 nMで試験した。ARC17480を、対照として全ての実験で、競合相手として含めた。各分子に関して、各競合アプタマー濃度で結合した放射標識したARC17480の割合を分析に使用した。結合した放射標識したARC17480の割合をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\max / (1 + x / IC_{50})) + \text{int}$ (式中、 y = 結合した放射標識したARC17480の割合、 x = アプタマーの濃度、 $\max$ = 最大の結合した放射標識したARC17480、および $\text{int} = y$ 切片) に当てはめて、結合競合についてのIC₅₀値を生成した。図20は

、ACJK-1、ACJK-2、ACJK-3、ACJK-4、ACJK-5、AD4903、およびAD4904で実行した結合競合実験を示す。これらの実験は、抗体AD4903が、ドットプロット競合アッセイにおいて、TFPIに結合するARC17480について競合したことを実証する（図20C）。ACJK-4が、本アッセイにおいて、結合について部分的に競合した（図20B）一方で、ACJK-1、ACJK-2、ACJK-3、ACJK-5、およびAD4904は、結合についてのARC17480との有意な競合を示さなかった（図20A～C）。これらの実験は、TFPIのK1領域およびK2～K3介在領域が、TFPIに結合するARC17480に関与していることを示唆する。

【0302】

総合すると、これらの実験は、TFPIのK1領域が、恐らくTFPIに結合するARC17480／ARC19499に関与していることを実証する。これらの実験は、TFPIのC末端およびK2～K3介在領域がアプタマー結合に関与し得ることも示唆する。TFPIの他の領域への抗体の結合競合の欠如は、アプタマー結合におけるそれらの関与を妨げない。

【表2】

表2：ARC19499競合アッセイで使用した抗体

抗体	種類	抗体生成の抗原として使用した成熟TFPIの領域	TFPI中の抗体の標的領域
AD4903	マウスモノクローナル	22～87	K1領域
AD4904	マウスモノクローナル	88～160	K2領域
ACJK-1	ウサギポリクローナル	261～276	C末端ペプチド
ACJK-2	ウサギポリクローナル	245-262	C末端ペプチド
ACJK-3	ウサギポリクローナル	192～204	K3ペプチド
ACJK-4	ウサギポリクローナル	148～162	K2～K3介在ペプチド
ACJK-5	ウサギポリクローナル	54～69	K1ペプチド
7035-A01	マウスポリクローナル	152～252	K3-C末端領域

【0303】

実施例8

本実施例は、ARC19499が、外因性テナーゼ（Xase）阻害アッセイにおいて、TFPIを阻害するインビトロ活性を有することを実証する。

【0304】

本アッセイにおいて、組織因子（TF）を、第VIIa因子（FVIIa）およびリン脂質小胞と混合した。第因子X（FX）を添加し、一定分量を除去し、様々な時点で反応停止させた。この時点で、第Xa因子（FXa）の発色性基質を添加し、FXa生成の速度を決定するために、405nmでの吸光度を1時間にわたって測定した。1nM TFPIを含ませた時、FXa生成の速度が著しく低下した。これは、図21Aにおいて、塗りつぶされたひし形（TFPIなし）を塗りつぶされていない円形（1nM TFPI）と比較した時に見られた。増加した濃度のARC19499を1nM TFPIとともに含ませた時、FXa生成の速度における用量依存的改善が見られた。1000nM ARC19499（塗りつぶされていないひし形）は、TFPI（塗りつぶされたひし形）の不在下でのFXa生成の速度に近いFXa生成の速度をもたらした（図21A）。1つの特定の時点（この場合、4分時点）の速度を、同一の時点でTFPIなしで得られた速度で割ることによって、これらの速度を正常化した（図21B）。この様式において、TFPIは、4分時点におけるFXa生成の速度を70%近く減少させた。増加した濃度のARC19499はこの速度を改善し、10~1000nMアプタマー付近でTFPIなしでのレベルに近いレベルに達した（図21B）。

10

【0305】

本実験は、ARC19499が、インビトロにおける外因性テナーゼ阻害アッセイにおいて、TFPIを阻害することを示唆する。

【0306】

実施例9

20

本実施例は、ARC26835、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882が、第Xa因子（FXa）活性アッセイにおいて、TFPI阻害活性を有することを実証する。

【0307】

各アプタマーを、第Xa因子（FXa）活性アッセイにおいて、TFPIの阻害について評価した。発色性基質を切断するFXaの能力を、場合によってはアプタマーを添加して、TFPIの存在および不在下で測定した。これらの実験について、2nMヒトFXaを、8nMヒトTFPIとともにインキュベートした。次いで、500μM発色性基質およびアプタマーを添加し、基質のFXa切断を、時間の関数として、405nm（A₄₀₅）での吸光度により測定した。アプタマーを、500nM、125nM、31.25nM、7.81nM、1.95nM、および0.49nM濃度で試験した。ARC17480を、各実験に対照として含んだ。各アプタマー濃度について、A₄₀₅を時間の関数としてプロットし、各曲線の直線領域を、等式 $y = mx + b$ （式中、 $y = A_{405}$ 、 $x =$ アプタマー濃度、 $m =$ 基質切断速度、および $b = y$ 切片）に当てはめ、FXa基質切断速度を生成した。TFPIの存在下、およびアプタマーの不在下でのFXa基質切断速度を、各濃度の各アプタマーにおいて、TFPIおよびアプタマーの両方の存在下での対応する値から減算した。次いで、調整した速度をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (V_{max} / (1 + IC_{50} / x))$ （式中、 $y =$ 基質切断速度、 $x =$ アプタマー濃度、および $V_{max} =$ 基質切断のp最大速度）に当てはめて、IC₅₀および最大（V_{max}）値を生成した。図22A~Cは、ARC26835、ARC17480、ARC19498、ARC19499、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882でのFXa活性アッセイのグラフを示す。アプタマー濃度の関数としてのFXa活性の増加から証明されるように、これらのアプタマー全てが、これらのアッセイにおいてTFPIを阻害した。これらのアプタマー全てが、FXaアッセイにおいて同様の活性を有した。

30

40

【0308】

実施例10

本実施例は、ARC19499が、精製成分での発色アッセイにおいて、第Xa因子（FXa）をTFPIによる阻害から保護することを実証する。

50

【0309】

FXa (1 nM)、TFPI (2.5 nM)、ARC19499 (0-500 nM)、および Spectrozyme Xa (American Diagnostica) 発色性基質 (200 μ M) を、平衡が得られるまで (5 分間)、2 mM CaCl₂ および 0.1 % PEG-6,000 (HBSP2 緩衝液) を含有する HEPES 緩衝生理食塩水 (20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) 中に 37 °C でインキュベートした。Spectrozyme FXa 加水分解の速度を、ThermoMax の器具 (Molecular Devices) を用いて決定し、TFPI なし (100 %) と比較した FXa 活性 % としてプロットした。増加した濃度の ARC19499 が FXa 活性の増加を引き起こし (図 23)、ARC19499 が FXa を TFPI による阻害から保護したことを実証する。このデータに基づいて、TFPI に対する ARC19499 の見かけの解離定数 (K_D) は 1.8 nM であった。ARC19499 は、TFPI に対して特異的であるが、TFPI の不在下において FXa 活性を阻害しなかった (データ示されず)。

10

【0310】

実施例 11

本実施例は、ARC19499 が、精製成分での発色活性アッセイにおいて、組織因子、第 VIIa 因子 (FVIIa) および第 Xa 因子 (FXa) から成る外因性 FXase 複合体を、TFPI による阻害から保護することを実証する。

【0311】

再脂質化された組織因子 (TF、20 pM)、FVIIa (1 nM)、PCPS 小胞 (75 % ホスファチジルコリン / 25 % ホスファチジルセリン、20 μ M)、および ARC19499 (0-1000 nM) を、37 °C で 10 分間、HBSP2 緩衝液中でインキュベートし、その後、FX (1 μ M) および TFPI (2.5 nM) を同時に添加した。一定分量を 30 秒毎に 5 分間除去し、20 mM EDTA および 0.1 % PEG を含有する HBS 緩衝液中で反応停止させた。Spectrozyme FXa 基質 (200 μ M) を添加し、基質の加水分解速度を測定し、活性 FXa の濃度を校正曲線から推定した。増加した濃度の ARC19499 が、TFPI の不在下で測定された速度の最大 70 % の FXa 活性の増加を引き起こし (図 24)、ARC19499 が、外因性 FXase 複合体を TFPI による阻害から実質的に保護することを実証する。

20

30

【0312】

実施例 12

本実施例は、ARC19499 が、精製成分を用いて実行される組織因子：FVIIa 活性の蛍光アッセイにおいて、組織因子：FVIIa 複合体を TFPI 阻害から保護することを実証する。

【0313】

組織因子 (TF、1 nM)、FVIIa (2 nM)、および ARC19499 (0-7.5 nM) を、37 °C で 10 分間、HBSP2 中でインキュベートし、その後、蛍光基質 SN-17c (50 μ M) および TFPI (8 nM) を同時に添加した。基質の加水分解速度を、蛍光プレートリーダー (BioTek) で測定した。TFPI は、これらの条件下で、TF：FVIIa 活性の約 50 % を阻害した (図 25)。ARC19499 の化学量論的濃度の添加 (8 nM) は、TFPI なしの対照と比較して、全ての TF：FVIIa 活性を完全に回復させ (図 25)、ARC19499 が TF：FVIIa 複合体を TFPI 阻害から効率的に保護したことを実証する。8 nM TFPI の存在下での増加した ARC19499 濃度の滴定は、ARC19499 濃度依存的様式で、TF：FVIIa 複合体の活性を増加させ、約 1 nM ARC19499 で活性の midpoint に達した。データ分析は、本アッセイにおける TFPI に対する ARC19499 の見かけの K_D が、1.2 nM であったことを示唆した。ARC19499 は、TFPI に対して特異的であるが、TFPI の不在下において TF：FVIIa 活性を阻害しなかった (データ示されず)。

40

【0314】

50

実施例 13

本実施例は、ARC19499が、血友病Aおよび血友病Bをモデル化する合成凝固プロテオームにおいて、TFPIを阻害することを実証する。これらのデータは、ARC19499が、完全なる（0%）第VII因子（FVII）または第IX因子（FIX）欠乏の存在下で、正常なトロンビン生成を回復させたことを示す。ARC19499は、不完全な（2%、5%、または40%）FVII欠乏の存在下で、正常なトロンビン生成も回復させた。

【0315】

トロンビン生成を、凝血促進剤および凝固阻害剤（第V因子、第VII因子、第VIIa因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、プロトロンビン、抗トロンビン、およびTFPI、全て平均生理学的濃度）および50 μM PCPS（75%ホスファチジルコリン／25%ホスファチジルセリン）の混合物に添加した5 pMの再脂質化された組織因子（TF）で開始した。長期にわたるトロンビン生成を、Spectrozyme TH基質（American Diagnostica）を用いて、発色アッセイにおいて測定した。ARC19499を、完全なる再構成系（健常な対照）、またはFVII（重度の血友病A）もしくはFIX（重度の血友病B）のいずれかを除外した再構成系において、1 nM、2.5 nM、5 nM、および10 nMの増加した濃度で試験した。

10

【0316】

全てのタンパク質の平均生理学的濃度のタンパク質（「健常な対照」、図26）の存在下で、5 pMの再脂質化されたTFで開始したトロンビン生成の開始（遅滞）期は約6分間であり、観察された活性トロンビンの最大濃度は270 nMであった（塗りつぶされたひし形）。TFPIの除外は、開始期を（2分まで）著しく短縮し、最大トロンビン濃度を374 nMに増加させた（塗りつぶされた円形）。2.5 nM TFPIの存在下における増加したARC19499濃度の添加は、ARC19499依存的様式で、開始期の継続期間を減少させ、最大トロンビン濃度を増加させ、10 nM（塗りつぶされていない四角形）で、ARC19499のトロンビン生成特性は、TFPIおよびARC19499の両方の不在下で観察されたトロンビン生成特性とほぼ同一であった（図26）。

20

【0317】

FVIIの不在下において、TFで開始されるトロンビン生成は著しく抑圧された（図27）。開始期を、「健常な対照」（塗りつぶされたひし形）の6分から、血友病A（塗りつぶされていないひし形）の10分に延ばし、最大トロンビン活性は、270 nMから34 nMに減少した。FVIIの不在下でのTFPIの除外は、正常なトロンビン生成を回復させ（活性トロンビンの最大濃度は264 nMまで増加し）、開始期の継続時間を2分まで遅延させた（塗りつぶされた円形）。FVIIの不在下および2.5 nM TFPIの存在下において、5 nM ARC19499（星印）の添加は、3分の開始期で、「健常な対照」で観察されたレベルまでトロンビン生成を回復させた。10 nM ARC19499（塗りつぶされていない四角形）および2.5 nM TFPIの存在下ならびにFVIIの不在下において、トロンビン生成特性は、TFPI、FVII、およびARC19499の不在下で観察されたトロンビン生成特性と類似した。

30

40

【0318】

血友病B（FIXなし）合成凝固プロテオームにおけるARC19499によるTFPI阻害の影響は、血友病Aモデルで観察されたTFPI阻害の影響に類似しており、言い換えると、5 nM濃度でFIXの不在下でのARC19499は、「健常な対照」で観察されたレベルに類似したレベルまでトロンビン生成を回復させた（図28）。

【0319】

TFにより開始されるトロンビン生成へのARC19499の影響を、0%、2%（0.014 nM）、5%（0.035 nM）、40%（0.28 nM）、および100%（0.7 nM）FVIIの合成凝固プロテオームモデルで評価した。選択したFVII濃度は、重度（1%未満）、中程度（1～5%）、および軽度（5～40%）の血友病A患

50

者で観察された範囲を包含した。ARC19499の不在下において（図29）、トロンビン生成は、試験した全てのFVII濃度で最大で40%抑圧された。40%FVIIプロテオーム（星印）において観察されたピークトロンビンレベルは、「健常な対照」の約50%であった（塗りつぶされたひし形）。1nMの濃度でのARC19499の添加は、開始期を短縮し、ピークトロンビンレベルを増加させて、トロンビン生成を著しく高めるのに十分であった（図30）。2.5nM ARC19499の添加が、0~5%FVIIの存在下でのトロンビン生成を本質的に正常化した（図31）一方で、40%および100%FVIIでの2.5nM ARC19499は、開始期のさらなる短縮を誘発し、ほぼ「TFPIなし」対照の程度までピークトロンビンを増加させた。

【0320】

図32は、「健常な対照」および「TFPIなし」対照と比較した、一連のARC19499濃度（0、1、2.5、5、および10nM）の存在下での0%FVIIのさらなる合成凝固プロテオームデータを示す。図33は、同一の範囲のARC19499濃度での100%FVIIのデータを示す。図34、35、および36は、それぞれ、0、1、および2.5nM ARC19499の存在下における2%、5%、および40%FVIIのデータを示す。全ての条件下で、ARC19499は、有意な凝固促進応答を示し、開始期（遅延時間）を減少、ピークトロンビンを増加させた。FVII欠乏の全ての事例（0~40%FVII）において、ARC19499は、正常なトロンビン生成特性を回復させることができた。

【0321】

実施例14

本実施例は、ARC19499のインビトロ活性が、TFPIの存在に対して特異であることを実証する。

【0322】

この実験では、組織因子凝固経路の開始後に長期にわたるトロンビンの生成を測定する自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイにおいて、トロンビン生成に影響を及ぼすARC19499の能力を、3つの異なる血漿条件下で試験した。第1の条件において、TF濃度が最終反応体積において0.1または1.0pMのいずれかになるように、増加した濃度のARC19499を、プールされた正常な血漿（PNP）に添加し、組織因子（TF）およびリン脂質を含有する溶液と混合した（図37）。トロンビン生成を、トロンビンの塩化カルシウムおよび蛍光基質を含有する混合物の添加により開始した。反応は37℃で起こり、蛍光強度を1時間にわたって定期的に測定した。ARC19499を、以下の血漿濃度：0.1、1、10、100、および1000nMで試験した。

【0323】

いずれかのTF濃度で、増加したARC19499は、PNP血漿中のトロンビン生成を増加させた（図37A~B）。内因性トロンビン生成能（ETP、曲線下面積）およびピークトロンビン（アッセイにおいていずれか1つの時点で生成されるトロンビンの最高レベル）値の両方ともに、ARC19499を伴って用量依存的様式で増加した（図37C~D）。遅延時間（トロンビン生成が開始するまでの時間）は、ARC19499を伴って用量依存的様式で減少した（図37E）。これらの結果は、両方のTFの濃度で観察された。

【0324】

ARC19499活性を測定するCATアッセイを、TFPIが枯渇した血漿中で繰り返した。TFPIを免疫枯渇して凍結乾燥した血漿を、American Diagnostica（Stamford, CT）から入手し、使用前に再懸濁した。トロンビン生成を、0.01、0.1、または1.0pM TFで上述のように測定した。図38Aの結果は、それぞれのTF濃度について測定されたトロンビン生成曲線が相互にはっきりと異なるが、特定のTF濃度内では、ARC19499濃度を増加させてもトロンビン生成に本質的な差異はなかった。これは、CATアッセイで測定されたパラメータにおいても見られた。ARC19499濃度を増加させても、ETP、ピークトロンビン、または遅延

時間にほとんど、あるいは全く変化がなく（図 3 8 B～D）、TF 濃度とは無関係であった。

【0325】

ARC19499 活性を、第 3 の一連の血漿条件下で試験した。この場合、PNP を、全てのTFPI 活性を中和させるために、TFPI に対して多クローン性抗体とともにインキュベートした。次に、ARC19499 を、この抗体で処理された血漿に添加した（図 3 9）。再び、トロンビン生成を、0.01、0.1、または1.0 pM TF のいずれかで開始した。TFPI を中和させたため、多クローン性抗体の添加は、全ての3つのTF 濃度でトロンビン生成を高めたが、増加した濃度のARC19499 は、トロンビン生成のさらなる増加を引き起こさないように見えた（図 3 9 A～C）。ARC19499 を添加した時、ETP、ピークトロンビン、または遅延時間への影響は皆無に等しかった（図 3 9 D～F）。

10

【0326】

これらの実験は、機能的TFPI が血漿中に存在する時に、ARC19499 は凝固促進活性のみを有し、したがって、ARC19499 がTFPI に対して特異的であることを示唆する。

【0327】

実施例 15

本実施例は、ARC17480、ARC19498、およびARC19499 が、TFPI 活性をインビトロで阻害することを実証する。

20

【0328】

本実験において、TFPI アプタマー（ARC17480、ARC19498、およびARC19499）の阻害活性を、自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイにおいて、プールされた血友病 A（第VII因子欠乏症）血漿においてインビトロで測定した。アプタマーを、プールされた血友病 A 血漿中の異なる濃度で滴定し、生成されたトロンビンの量を、最終反応物中の1.0 pM TF を用いて、プールされた正常な血漿対照（図 4 0 A～C）と比較した。時間曲線に対するトロンビン生成下面積である内因性トロンビン生成能（ETP）と、本実験にわたって生成されたトロンビンの最高濃度であるピークトロンビンの両方ともに、TFPI のアプタマー阻害の間接的測定をもたらした。3つのアプタマー全てが本アッセイにおいて同様の活性を有し、ARC19499 が他の2つよりもわずかに高い活性を有した。ARC19499 は、30 nM の時点で、ETP を正常なレベル近くまで補正した（図 4 0 D）。ピークトロンビンレベルは、アプタマーの増加した濃度に伴い増加した（図 4 0 E）。

30

【0329】

これらの結果は、ARC17480、ARC19498、およびARC19499 が、TFPI 活性をインビトロで阻害することを示す。

【0330】

実施例 16

本実施例は、ARC19499 が、血友病 A 様の状態を生成するために抗第VII因子抗体で処理された正常なヒト血漿において、トロンビン生成を増加させることを実証する。

40

【0331】

健常な志願者由来の血小板に乏しい血漿を、抗FVII抗体で処理し、血友病 A 様の状態を生成した。この抗体で処理された血漿中のトロンビン生成は、血友病 A 血漿で観察されたトロンビン生成と類似した（図 4 1）。抗体で処理された血漿へのARC19499 の添加は、トロンビン生成において用量依存的増加をもたらした。これらの結果は、ARC19499 が、抗FVII抗体での処理に起因する、血漿中のトロンビン生成を低FVIIレベルで補正することができることを実証する。

【0332】

実施例 17

50

本実施例は、A R C 1 7 4 8 0 および A R C 1 9 4 9 9 が、T F P I 活性をインビトロで阻害し、生物学的活性を有することを実証する。

【0333】

非 P E G 化コア T F P I 阻害アプタマー A R C 1 7 4 8 0 および P E G 化アプタマー A R C 1 9 4 9 9 の影響を、自動校正トロンビン生成 (C A T) アッセイを用いて、血友病 B (F I X - 欠乏) 血漿におけるインビトロでのトロンビン生成活性について評価した。

【0334】

これらの研究を、1%未満の第 I X 因子レベルを有する2人の血友病 B 患者からプールした血漿 (G e o r g e K i n g B i o - M e d i c a l , I n c , O v e r l a n d P a r k , K S より市販) において実行した。本アッセイにおいて、血漿およびアプタマーを混合し、リン脂質および組織因子を含有する試薬に添加した。トロンビン生成を、トロンビンの塩化カルシウムおよび蛍光基質を含有する混合物の添加により開始した。反応は 37℃ で起こり、蛍光強度を、1 時間にわたって定期的に測定した。組織因子およびリン脂質の最終濃度は、それぞれ、1 p M および 4 μ M であった。アプタマーを、以下の血漿濃度：0.3、1、3、10、30、100、300、および 1000 n M で試験した。個々のトロンビン生成曲線が図 4 2 に示され、プールされた正常な血漿と比較した、血友病 B 血漿中のトロンビン生成の程度への増加した濃度の A R C 1 9 4 9 9 (図 4 2 A) または A R C 1 7 4 8 0 (図 4 2 B) の影響を説明する。E T P、ピークトロンビン、および遅延時間のプロットが図 4 3 に示される。A R C 1 9 4 9 9 での結果が左側に示され、A R C 1 7 4 8 0 での結果が右側に示される。

【0335】

E T P およびピークトロンビンレベルは、血友病 B プール由来の血漿において、プールされた正常な血漿と比較して、それぞれ、約 85% および約 95% 減少し、第 I X 因子の欠損によるトロンビン生成の欠乏と一致した。これらのパラメータの両方で測定されるように、A R C 1 7 4 8 0 (三角形) および A R C 1 9 4 9 9 (ひし形) の両方ともに、トロンビン生成における欠陥を大いに補正した (図 4 3)。100 n M の時点で、両方のアプタマーはプールされた正常な血漿で得られた E T P とほぼ同等の E T P を示し、A R C 1 7 4 8 0 の 300 n M 時点で、ほぼ同等のピークトロンビンを示した (図 4 3)。ピークトロンビンは、A R C 1 9 4 9 9 の 300 n M の時点でプラトー状態となった。A R C 1 7 4 8 0 および A R C 1 9 4 9 9 は、血友病 B 血漿の遅延時間を減少させ、薬物を有さないプールされた正常な血漿および任意の血友病 B 血漿で得られたものを下回った (図 4 3)。

【0336】

これらの結果は、A R C 1 7 4 8 0 および A R C 1 9 4 9 9 が、血友病 B 血漿と同様の効力で T F P I をインビトロで阻害することを示す。

【0337】

実施例 18

本実施例は、A R C 1 9 4 9 9 が、陰性対照アプタマーと比較して、T F P I 活性をインビトロで阻害し、生物学的活性を有することを実証する。

【0338】

トロンビン生成を高める A R C 1 9 4 9 9 の能力を、3つの血小板に乏しい血友病血漿：7~8人の重度の血友病 A を有する患者 (1%未満の F V I I I レベル、「血友病 A 血漿」と称される) からプールした血漿、抗 F V I I I 抗体の高力価を有する3人の異なる血友病 A 患者 (160 ベセズダ単位 (B U) / m L 以上、「インヒビター血漿」と称される) からプールした血漿、および2人の重度の血友病 B を有する患者 (1%未満の F I X レベル、「血友病 B 血漿」と称される) からプールした血漿において試験した。全ての血漿を、G e o r g e K i n g B i o - M e d i c a l (O v e r l a n d P a r k , K S) から入手した。トロンビン生成を、自動校正トロンビン生成 (C A T) アッセイを用いて測定した。本アッセイにおいて、血漿およびアプタマーを混合し、リン脂質および組織因子を含有する試薬に添加した。トロンビン生成を、トロンビンの塩化カルシウムお

よび蛍光基質を含有する混合物の添加により開始した。反応は37℃で起こり、蛍光強度を、1時間にわたって定期的に測定した。組織因子およびリン脂質の最終濃度は、それぞれ、1 pMおよび4 μMであった。ARC19499 (0.3、1、3、10、30、100、300、および1000 nM) の存在下でのトロンビン生成を、陰性対照アプタマー (0.1、1、10、100、および1000 nM) と比較した。ETP、ピークトロンビン、および遅延時間 (平均±標準誤差) のプロットが、図44に示される。

【0339】

血友病A血漿は、正常な血漿と比較して、わずかに短い遅延時間を有し、ETPおよびピークトロンビンを著しく減少させた (それぞれ、約50%および約75%)。増加した濃度のARC19499は、トロンビン生成における欠陥を大いに補正した。ETPを、3 nM ARC19499で正常なレベル近くまで補正し、ピークトロンビンを100 nM アプタマーで補正した (図44A)。インヒビター血漿は、正常な血漿と比較して、ETPおよびピークトロンビンも減少させた (それぞれ、約50%および約70%)。重度の血友病A血漿と同様に、ARC19499は、本血漿中のトロンビン生成を増加させた。30 nM ARC19499では、ETPおよびピークトロンビンの両方ともに正常なレベルであった (図44B)。血友病Bは、トロンビン生成におけるさらに大きな欠陥を有し、ETPおよびピークトロンビンを著しく減少させ (それぞれ、約70%および約90%)、遅延時間を増加させた。血友病A血漿と同様に、増加した濃度のARC19499は、本血漿中のトロンビン生成を改善し、30 nM ARC19499で正常なETPレベル、100~300 nMアプタマーで正常なピークトロンビンレベルを得た (図44C) (20)。総合すると、これらの結果は、30~100 nM ARC19499は、3つの異なる種類の血友病血漿中の凝固を回復させるのに有効であることを実証する。陰性対照アプタマーも同様に3つの異なる血漿において試験したが、トロンビン生成の補正を示さなかった (図44)。

【0340】

本実施例で使用した陰性対照アプタマーARC32603の配列は、mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-mG-dC-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (配列番号152) であった。

【0341】

実施例19

本実施例は、ARC17480、ARC26835、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882が自動校正トロンビン生成 (CAT) アッセイにおいて生物学的活性を有するとを実証する。

【0342】

各アプタマーのTFPI阻害活性を、CATアッセイにおいて、500 nM、167 nM、55.6 nM、18.5 nM、6.17 nM、および2.08 nMアプタマー濃度のプールされた血友病A血漿中で評価した。ARC17480を対照として全ての実験に含めた。各アプタマーについて、各アプタマー濃度の内因性トロンビン生成能 (ETP) およびピークトロンビン値を分析に使用した。血友病A血漿のみのETPまたはピークトロンビン値を、各濃度での各分子について、アプタマーの存在下での対応する値から減算した。次いで、調整したETPおよびピーク値を、アプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\max / (1 + IC_{50} / x)) + \text{int}$ (式中、 y = ETPまたはピークトロンビン、 x = アプタマー濃度、 $\max$ = 最大ETPまたはピークトロンビン、および $\text{int} = y$ 切片) に当てはめて、ETPおよびピークトロンビン両方の IC_{50} 値を生成した。図45A~Dおよび図46A~Bは、ARC17480、ARC26835、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882でのCAT実験のグラフを示す。調整した内因性トロンビン生成能 (ETP) およびピークトロンビンの両方が示される。これらの実験は、血友病A

10

20

30

40

50

血漿のETPおよびピークトロンビンにおける濃度依存的増加で証明されるように、ARC17480、ARC26835、ARC19500、ARC19501、ARC31301、ARC18546、ARC19881、およびARC19882の全てが、CATアッセイにおいて、TFPIを機能的に阻害することを実証する。これらの分子全てが、CATアッセイにおいて同様の活性を有した。

【0343】

実施例20

本実施例は、TFPIアプタマーが生物学的活性を有することを実証する。

【0344】

本実験において、NovoSeven（登録商標）の能力と比較した、トロンビン生成に影響を及ぼすARC19499の能力を、自動校正トロンビン生成（CAT）アッセイを用いて試験した。CATアッセイは、いくつかのパラメータを生成してトロンビン生成と比較する。遅延時間は、トロンビン生成が開始するまでの時間の長さの測定である。ピークトロンビンは、任意の一時点での生成されるトロンビンの最大量の測定である。内因性トロンビン生成能（ETP）は、トロンビン生成曲線下面積である。

【0345】

これらの研究を、3つの異なる血漿：健常な志願者由来の血小板に乏しい血漿、1%未満の第VII因子レベルを有する血友病A患者由来の血漿のプール（George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KSから市販）、および第VII因子に対して阻害剤抗体の高力価を有する血友病A患者由来の血漿（George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KSから市販）の存在下で実行した。CATアッセイにおいて、血漿および薬物（ARC19499またはNovoSeven（登録商標）のいずれか）をともに混合し、リン脂質および組織因子を含有する試薬に添加した。トロンビン生成を、トロンビンの塩化カルシウムおよび蛍光基質を含有する混合物の添加により開始した。反応は37℃で起こり、蛍光強度を、1時間にわたって定期的に測定した。組織因子およびリン脂質最終濃度は、それぞれ、1pMおよび4μMであった。薬物を、以下の血漿濃度：0.3、1、3、10、30、100、および300nMで試験した。

【0346】

健常な志願者由来の血漿において、ARC19499およびNovoSeven（登録商標）で試験した濃度の範囲にわたってETPの変化はなかった（図47A）。ピークトロンビンレベルは、より高い用量でわずかに増加し、ARC19499およびNovoSeven（登録商標）は、ほぼ同一の様式を示した（図47B）。ARC19499がトロンビン生成の遅延時間に影響を与えなかった一方で、NovoSeven（登録商標）は、遅延時間の用量依存的減少を示し、30nMの時点で最小遅延時間に達した（図47C）。

【0347】

ETPおよびピークトロンビンレベルは、血友病Aプール由来の血漿において、それぞれ、約40%および約75%減少し、第VII因子の欠損によるトロンビン生成の欠乏と一致した。ARC19499およびNovoSeven（登録商標）は、これらのパラメータの両方で測定されるように、トロンビン生成における欠陥を大いに補正した。これらの作用物質は、ほぼ同等のETPへの影響を示し、30nMの時点で最大ETPに達した（図48A）。NovoSeven（登録商標）は、ピークトロンビンにわずかに高い影響を与え、30nMの時点で最大レベルに達した。ARC19499は、300nMで同一のピークトロンビンのレベルに達した（図48B）。健常な志願者由来の血漿において見られるように、ARC19499が遅延時間に影響を与えなかった一方で、NovoSeven（登録商標）は、遅延時間の用量依存的減少を示し、30nMで最大の影響に達した（図48C）。

【0348】

同様の結果が、高力価抗体を有する患者由来の血漿において見られた。両方の薬物ともに

、同一の様式でE T Pおよびピークトロンピンを増加させた（図49A～B）。この場合もやはり、A R C 1 9 4 9 9が遅延時間に影響を与えなかった一方で、N o v o S e v e n（登録商標）は、遅延時間の用量依存的減少を示した（図49C）。インヒビター血漿に関連する標準誤差は、健常な血漿または血友病Aプールにおいて見られた標準誤差よりも高かった。これは、3人のインヒビター患者（160BU/mL、533BU/mL、および584BU/mL）の間の力価における差異による可能性が高い。

【0349】

全体的に見て、遅延時間を除いて、A R C 1 9 4 9 9およびN o v o S e v e n（登録商標）は、試験した全ての血漿におけるトロンピン生成に非常に類似した影響を与えた。

【0350】

実施例21

本実施例は、T F P I アプタマーが生物学的活性を有することを実証する。

【0351】

本実験において、N o v o S e v e n（登録商標）の能力と比較した、血栓形成に影響を及ぼすA R C 1 9 4 9 9の能力を、トロンボエラストグラフィー（T E G（登録商標））アッセイを用いて試験した。T E G（登録商標）アッセイは、発達する血餅の機械的性質を測定する。T E G（登録商標）アッセイにおいて、血液生成物および任意の活性化因子を含有するカップを、捻れワイヤに取り付けられたピン周囲で自由に振動させる。血餅が発達するにつれて、新しく形成されたフィブリン鎖は、振動したカップを固定されたピンに接続させ、ピンを引っ張り始め、したがって、捻れワイヤへの力を生成する。この力は、血栓形成を監視するコンピュータによりシグナルに変換され、時間に対するシグナルの高さのトレースとして示される。このトレースから、様々な態様の血栓形成を測定するいくつかのパラメータを抽出することができる。R値は、最初の血餅が発達するまでの時間を測定する。角度は、血餅が形成する速度の測定である。最大振幅（MA）は、血餅強度および安定性の測定である。

【0352】

これらの研究を、健常な志願者由来のクエン酸全血において実行した。第1のアッセイにおいて、薬物を、処理されていない全血において試験した。第2のアッセイにおいて、血液をまず、薬物添加前に、37℃で3時間、ヒト第V I I I因子に対してヒツジ多クローン性抗体で処理した。両方のアッセイにおいて、N o v o S e v e n（登録商標）またはA R C 1 9 4 9 9を、0.01、0.1、1、10、または100nMの最終血液濃度で、血液（抗体で処理された血液または処理されていない血液）に添加した。凝固の活性化は、最終希釈1：200000（約6fM）の組織因子（I n n o v i n）および最終濃度11mMの塩化カルシウムの添加時に起こった。

【0353】

処理されていない血液において、A R C 1 9 4 9 9およびN o v o S e v e n（登録商標）の両方ともに、10nMで最小値に達するように見えたR値の中程度の用量依存的減少を示した（図50A）。角度およびMA値は、試験した濃度にわたって変化しないままであった（図50B～C）。

【0354】

第V I I I因子抗体で処理された血液において、両方の薬物ともに、R値に同様の影響を与えた。処理されていない血液と比較して、抗体で処理された血液のR値は延長された。A R C 1 9 4 9 9またはN o v o S e v e n（登録商標）の濃度が増加するにつれて、R値は、処理されていない血液のレベルと同一のレベルに回復した（図51A）。抗体処理は、血液中の血栓形成の速度を減少させ、その角度により報告される。N o v o S e v e n（登録商標）は、角度に強い影響を与え、0.1から100nMのN o v o S e v e n（登録商標）に直線的に増加させた。この増加は、処理されていない血液で得られた角度を超えた。A R C 1 9 4 9 9も角度を増加させたが、値は、処理されていない血液で得られたレベルと同様のレベルで、アプタマーの10nMの時点でプラトー状態となるように見えた（図51B）。MAへの影響は、主として、全血のMAにおける大きな差異がある

ように見えないため、F V I I I 抗体処理にかかわらず、両方の薬物において最小であった。両方の薬物ともに、処理されていない血液で得られたMA値と、抗体で処理された血液で得られたMA値との間に収まるMA値をもたらした。(図51C)。

【0355】

CATアッセイで見られるように、ARC19499およびNovoSeven(登録商標)は、第V I I I 因子を欠乏したか否かにかかわらず、全血における血栓形成に非常に類似した影響を与えた。この2つの薬物の間の主な違いは、血栓形成の速度(角度)への影響において見られ、NovoSeven(登録商標)は、濃度が増加するにつれて、速度においてより直線的な増加を示すが、ARC19499も同様に、速度を増加させる。

【0356】

実施例22

本実施例は、TFPIアプタマーが生物学的活性を有することを実証する。

【0357】

本実験において、トロンビン生成におけるARC19499と第V I I I 因子との間の相乗効果を、自動校正トロンビン生成(CAT)アッセイを用いて試験した。これらの研究を、1%未満の第V I I I 因子(FV I I I)レベルを有する血友病A患者由来の血漿のプール(George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KSから市販)の存在下で実行した。増加した濃度のARC19499(1~300nM)を、0、1.4、2.5、5、14、および140%の第V I I I 因子(World Health Organization International Standard)の存在下で分析した。結果を、ARC19499の不在下での血友病Aおよびプールされた正常な血漿のベースライン応答と比較した。

【0358】

正常な血漿および血友病A血漿が他の点では同等であると想定して、血友病A血漿における第V I I I 因子の不在は、本実験において、正常な血漿と比較して、トロンビン生成のベースライン遅延時間の限界に近い減少(図52A)、ピークトロンビン濃度の3~4倍の減少(図52B)、および内因性トロンビン生成能(ETP)の1.5~1.6倍の減少(図52C)を引き起こした。第V I I I 因子の不在下において、ARC19499は、トロンビン生成の遅延時間にほとんど、あるいは全く影響を及ぼさなかったが、ピークトロンビン濃度およびETPにおける用量依存的増加を引き起こした。外因性第V I I I 因子の添加は、全てのパラメータにおいて漸進的な変化を引き起こし、最大の影響がピークトロンビン濃度で観察された(図52B)。140%の第V I I I 因子での再構成は、このパラメータを正常な血漿において観察されたレベルに類似したレベルまで回復させ、より小さい改善が14%以下の第V I I I 因子で観察された。さらに、それぞれの第V I I I 因子濃度により引き起こされたピークトロンビンにおける漸進的な増加は、ARC19499の全ての濃度でほぼ同一であり、このことは、トロンビン生成へのその2つの作用物質の影響が、相乗的というよりもむしろ相加的であることを示唆する。ETPにおいて、第V I I I 因子は、ARC19499の用量応答曲線を平らにし、相加的効果は、より低い濃度のARC19499でのみ観察された(図52C)。いったんARC19499の10nMに達すると、さらなる第V I I I 因子は利益を有するよう見えなかった。図53Aは、FV I I I を添加した異なる濃度の血友病A血漿のETPを示す(点線)。ARC19499の添加は、血友病A血漿および5%FV I I I を添加した血友病A血漿において用量依存的増加をもたらした。ARC19499は、ETPを評価した時の1~10nMアプタマー(図53A)、またはピークトロンビンを評価した時の10~30nMアプタマーでの14%FV I I I に類似した血友病A血漿における凝血促進効果を媒介した。ARC19499の飽和量(300nM)を異なる濃度のFV I I I を有する血漿に添加した時、トロンビン生成レベルは正常な血漿で観察されたレベルに近く、このことは、ARC19499が重度の血栓形成促進効果を有さないことを示唆する(図53B)。140%第V I I I 因子をもってしても、正常な血漿のETPレベルに一度も達しなかった。したがって、この測定により、外因性第V I I I 因子の添加は、その作用を促進する

10

20

30

40

50

というよりはむしろ、ARC19499様のバイパス剤の必要性を未然に防ぐように見えた。興味深いことに、ARC19499は、第VII因子のより高い濃度で遅延時間を減少させるように見えた（図52A）。

【0359】

この事例におけるTFPIの阻害は、より迅速なトロンビン生成の第VII因子依存的増殖を可能にし得る。

【0360】

実施例23

本実施例は、ARC19499が、固定化組織因子で活性化された血友病血漿中の血栓形成の空間的モデルにおける凝固を改善することができることを実証する。

10

【0361】

空間実験モデルの主要な性質は、血漿凝固が固定化組織因子（TF）で被覆される表面により活性化されることである。次に、フィブリンゲルが増殖して、巨大な血漿になる。凝固は、特別に設計されたチャンバ内で起こる（図54A）。血漿試料を、チャンバのウェルに装填し、その後、サーモスタット内に設置する。全ての実験を37℃で実行する。チャンバ内へのその端面上に固定化されるTFの挿入物の浸漬により、凝固を開始する。血栓形成を、CCDカメラを用いて、フィブリンゲルからの光散乱により登録する（図54B）。チャンバを、単色光で均一に照射し、画像を15秒毎に捕捉する。次に、入手した一連の画像をコンピュータで処理し、血液凝固の空間的動態のパラメータを計算する。

【0362】

この一連の実験のために、表面を、 $1 \sim 100 \text{ pmole/m}^2$ の範囲のTF密度で誘導体化した。表面上のTFの密度は、過剰な第VIIa因子（Novoseven（登録商標）、Novo Nordisk）の存在下で、発色性第Xa因子基質S-2765（Chromogenix）を用いて、第X因子（Enzyme Research Laboratories）を活性化する能力を特徴とした。S-2765切断の速度を光吸収（405nm）で測定し、一式のTF標準溶液（American Diagnostica）を用いて調製された校正曲線と比較して、TF濃度を計算した。

20

【0363】

それぞれの光散乱画像を、活性化表面に引かれた垂線に沿って（画素強度に基づく）平均光散乱強度を計算することにより処理した。各画像のデータを、活性化表面からの距離に対する光散乱強度のプロット上に一本の等高線として示した（図55）。血餅増殖を、最大90分の連続した時点に取り込まれた画像から決定した増加した光散乱強度の連続した等高線により質的に（図55）、または時間に対する血餅の大きさをプロットすることにより量的に（図56）示した。各画像における血餅の大きさを、散乱強度が最大半減である等高線に沿って、座標（マイクロメートルまたはミリメートル単位）として決定した。時間プロットに対する血餅の大きさに基づいて、以下のパラメータ：遅延時間（活性化因子との血漿の接触と血栓形成の開始との間の遅延）、血餅成長の初期速度（ α もしくは $V_{\text{初期}}$ 、遅延時間後の最初の10分間にわたる時間曲線に対する血餅の大きさの平均勾配）、血餅成長の空間速度または定常速度（ β もしくは $V_{\text{定常}}$ 、翌30分間にわたる平均勾配）、および本実験の60分後の血餅の大きさ（血栓形成効率の積分パラメータ）を計算した。各実験について、活性化因子表面に沿って、異なる時点から4つの垂線を引いた。時間に対する血餅の大きさの特性を分析し、それぞれの凝固パラメータの4つの値を得て、次に、平均化して平均を得た。

30

40

【0364】

この研究をまず、（業務用血漿または凍結血漿ではなく）健常なドナーおよび血友病A患者由来の新たに調製された血漿を用いて行った。血液を、健常な志願者および血友病A患者から9：1のv/v比で収集して、3.8%クエン酸ナトリウムおよび0.2mg/mL CTI（Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences）を含有する溶液に入れ、次に、1,500gで15分間の遠心分離で処理し、血小板に乏しい血漿を得た。これを10,00

50

0 gで5分間さらに遠心分離し、血小板を含まない血漿を得た。正常な血漿の新鮮なプールを、それぞれ3人の健常なドナーから調製した。実験の15分前の時点で、300 μ Lの血漿を18 μ LのARC19499または組換え第VIIa因子（あるいは、指定されたrVIIaもしくはNovoseven（登録商標））で補充した。ARC19499または第rVIIa因子を欠乏する対照実験において、血漿を、同一の容量のリン酸緩衝生理食塩水で補充した。血漿を6 μ Lの1M CaCl_2 の添加により再石灰化し、混合し、300 μ Lの再石灰化された血漿を実験用チャンバ内に設置した。次に、TF誘導体化表面を有する挿入物をチャンバ内に設置し、凝固を開始した（図54A）。

【0365】

300 nMのARC19499を有する正常なプールされた血漿およびARC19499を有さない正常なプールされた血漿中の1 pmol e/m^2 のTF密度により活性化された、典型的な空間的血栓形成実験の結果が、それぞれ、図55Aおよび図55Bに示される。プロットは、活性化因子からの距離の関数として光散乱の輪郭を示す。2つの輪郭の間の時間は2.5分間であり、各実験の総使用時間は90分間である。図55Aと比較した図55Bの各時点での光散乱の強化は、ARC19499の添加が空間的血栓形成を改善したことを示唆する。しかしながら、血栓形成へのARC19499の影響は、処理された散乱データから算出された時間に対する血餅の大きさのプロットにおいてより明確に見られ、遅延時間、 $V_{\text{初期}}(\alpha)$ 、および60分時点での血餅の大きさにおける改善は観察可能である。

【0366】

血栓形成パラメータを、図57に示されるTF表面密度の関数としてプロットした。縦のエラーバーが血餅パラメータの標準偏差を示し、一方で、「n」は特定のTF密度で実行した実験の数である。横のバーは、TF密度の決定についてのSDである（それぞれの活性化因子シリーズにおいて $n=2$ ）。図57Aは、活性化因子TF密度への平均遅延時間依存度を示す。ARC19499によるTFPI阻害の大きさはTF密度によって決まり、密度が減少するにつれてより著しくなった（TF密度1~3 pmol e/m^2 での遅延時間において最大2.5倍の短縮）。図57Bは、活性化因子TF密度への平均的な初期血餅成長速度の依存度を示す。この場合もやはり、ARC19499の影響は、初期速度において約1.8倍の増加が観察された低TF密度（1~3 pmol e/m^2 ）でのみ有意であった。図57Cは活性化因子TF密度への血餅成長定常速度の依存度を示し、ARC19499は、活性化因子の全範囲にわたって血餅増殖速度にほとんど影響を与えなかった。最後に、図57Dは、60分後の平均的な血餅の大きさを示す。TFPIの阻害は、1~4 pmol e/m^2 の密度で血餅の大きさに影響を及ぼし、ARC19499の影響は、TF密度が増加するにつれてわずかになった。これらのデータに基づいて、2つのTF密度：低TF密度1~2 pmol e/m^2 、および中程度のTF密度10~20 pmol e/m^2 を、ARC19499のさらなる研究のために選択した。いくつかのロットの活性化因子をこれらのTF密度のそれぞれにおいて調製し、低密度および中程度の密度の活性化因子の平均値は、それぞれ、 2.0 ± 0.68 ($n=22$ ロット) および 20.6 ± 8.90 pmol e/m^2 ($n=5$ ロット) であった。

【0367】

正常なプールされた血漿における異なるARC19499濃度（0~1000 nM）の空間的凝固への影響を評価し、ARC19499の影響の用量依存度を試験した。図58は、異なる正常な血漿プール（ $n=4$ ）および低表面TF密度での実験の平均（標準誤差）の平均誤差および標準誤差を示す。最大30 nMまでのARC19499濃度の増加の増加に伴って遅延時間（図58A）は減少し、それから安定した。ARC19499濃度の増加に伴って初期速度（図58B）は約30%増加した一方で、定常速度（図58C）は、濃度の全範囲にわたって著しく影響を及ぼさなかった。ARC19499濃度の増加に伴い、60分時点での血餅の大きさ（図58D）において検出可能な増加があった。影響を受けた全てのパラメータに関して、ARC19499の最大の影響が300 nMで得られ、最大半減の影響の濃度は10 nM未満であった。図59は、図57および図58から

の未加工データと合わせた低TF密度での0～300 nMのARC19499の凝固パラメータの平均（±標準誤差）を示す（n=6）。ARC19499の影響の統計的有意性を計算するために、各パラメータ値の間の差異を各実験において計算し、これらの差異の分布を、t検定を用いてゼロと比較した。星印は、統計的有意性（P0.05未満）を示し、±ARC19499の間の値の差異がゼロとは異なることを示す。遅延時間および血餅の大きさへの影響が一番大きかったが、4つ全てのパラメータへの影響は統計的に有意であった。

【0368】

図60は、ARC19499濃度の関数としてプロットした、異なる正常な血漿プール（n=3）および中程度の表面TF密度での実験における平均パラメータ（±標準誤差）を示す。ARC19499の凝固への影響は、この実験においてより小さかった。図61は、4つ全ての凝固パラメータについて、0 nMのARC19499と300 nMのARC19499を比較した統計的分析を示す。差異のいくつかが統計的に有意であるように見えたが（星印で示される）、中程度のTF密度で活性化された正常な血漿におけるARC19499の凝固への影響は非常に小さかった。

【0369】

血友病A血漿中の低密度のTFで活性化された典型的な空間的血栓形成が図62に示される。プロットは、血友病A血漿のみ（図62A）および100 nM ARC19499（図62B）または100 nM rVlla（図62C）を含有する血友病A血漿について、活性化因子からの距離の関数として光散乱の特性を示す。本データが算出された光散乱画像の例が図63に示され、処理データから算出された時間に対する血餅の大きさのプロットが図64に示され、正常な血漿特性を比較のために含めた。これらのデータに基づいて、ARC19499は、遅延時間を短縮し、血餅の大きさを増加させることにより、空間的血栓形成を改善した。図64に示されるように、100 nM ARC19499は、血栓形成を部分的に正常化し、活性化表面からの血餅増殖を促進した。対照的に、100 nM rVllaは、強力なTF非依存性の凝固を刺激した。活性化表面からの空間的血餅増殖の正常化を刺激するというよりはむしろ、この濃度のrVllaは、反応チャンバの至るところで凝固を誘発した。

【0370】

さらなる実験は、様々な血友病患者の血漿におけるARC19499の濃度依存的影響を特徴付けた。試料を得た患者プールの人口動態が、図65の表に示される。患者の全てが、重度（1%未満）または中程度（1～5%）のFVlla欠乏を有した。図66、図67、および図68は、それぞれ、患者番号1、2、および3の血漿における低密度のTFで活性化された空間的血栓形成へのARC19499およびrVllaの影響を示す。この時点より、エラーバーは、単一実験内の増殖するフィブリン血餅の前面に沿ったn=4領域の標準誤差を示す。これらの図のパネルAおよびパネルBは、それぞれ、ARC19499およびrVlla濃度への遅延時間依存度を示す。遅延時間は2倍減少し、ARC19499の濃度は0から最大30 nMまで増加し、より高いARC19499濃度においては、遅延時間のさらなる著しい変化はなかった。同一の図のパネルCおよびパネルDは、それぞれ、ARC19499およびrVlla濃度への初期速度依存度を示す。初期速度は2倍増加し、ARC19499の濃度は0から最大30 nMまで増加し、より高いARC19499濃度においては、さらなる著しい変化はなかった。図69は、1つのグラフにおける3人全ての患者のARC19499およびrVlla濃度への血餅成長定常速度の依存度を示す。ARC19499は、全体の調査した濃度範囲にわたって定常速度に影響を与えなかった一方で、rVllaの添加は、本パラメータの強力な増加につながった。最後に、図70は、ARC19499（図70A）およびrVlla（図70B）への60分時点での血餅の大きさの依存度を示す。60分時点での血餅の大きさは1.5～2倍増加し、ARC19499の濃度は0から最大30 nMまで増加し、より高いARC19499濃度においては、さらなる著しい変化はなかった。0 nM ARC19499および300 nM ARC19499についての各パラメータを比較した、低TF密度

データの統計的分析が図 7 1 に示される。A R C 1 9 4 9 9 は、遅延時間（図 7 1 A）、初期速度（図 7 1 B）、および 6 0 分時点での血餅の大きさ（図 7 1 D）に著しく影響を与えたが、定常速度（図 7 1 C）には影響を与えなかった。

【0371】

図 7 2、図 7 3、および図 7 4 は、それぞれ、患者番号 4、5、および 6 の血漿における中程度の密度の T F で活性化された空間的血栓形成への A R C 1 9 4 9 9 および r V I I a の影響を示す。A R C 1 9 4 9 9 は、試験した全範囲の濃度にわたって、中程度の密度の活性化因子についての凝固パラメータにほとんど影響を与えなかった。0 n M A R C 1 9 4 9 9 および 3 0 0 n M A R C 1 9 4 9 9 についての各パラメータを比較した、中程度の T F 密度のデータの統計的分析が図 7 5 に示される。A R C 1 9 4 9 9 は、これらの条件下において、4 つの凝固パラメータのうちのいずれにも著しい影響を与えなかった。

10

【0372】

低 T F 密度の条件下で A R C 1 9 4 9 9 での凝固正常化の程度を推定するために、図 7 6 は、正常な血漿と比較した、3 0 0 n M の A R C 1 9 4 9 9 を有する血友病 A および血友病 A についての平均凝固パラメータを示す。A R C 1 9 4 9 9 は、正常なレベル未満に遅延時間を短縮し、初期速度を正常化した。定常速度には影響を与えなかった。A R C 1 9 4 9 9 は、6 0 分時点での血餅の大きさを約 2 倍、正常な値の 3 0 % から最大 6 0 % まで増加させた。A R C 1 9 4 9 9 の影響が、正常な血漿および血友病 A 血漿において異なるかを確認するために、3 0 0 n M の A R C 1 9 4 9 9 を有する場合の比率および 3 0 0 n M の A R C 1 9 4 9 9 を有さない場合の比率を、4 つ全ての凝固パラメータについてプロットした [比率 = (パラメータ)_{+ A R C 1 9 4 9 9} / (パラメータ)_{- A R C 1 9 4 9 9}]（図 7 7）。血友病 A 血漿および正常な血漿の両方において、遅延時間比は約 0.5 であり、このことは、3 0 0 n M A R C 1 9 4 9 9 の添加がそれぞれの遅延時間を約半分に減少させることを示唆する。V_{定常} についての比率もそれらの血漿の間において同様であった。しかしながら、正常な血漿と比較して、血友病 A 血漿において V_{初期} および 6 0 分時点での血餅の大きさでより大きな比率が観察され、このことは、血友病 A 血漿における A R C 1 9 4 9 9 の最大の影響が、正常な血漿における最大の影響をわずかに超えたことを示唆する。

20

【0373】

血友病 A 血漿における A R C 1 9 4 9 9 の I C₅₀ を決定するために、低 T F 密度に対する A R C 1 9 4 9 9 濃度（最大 1 0 n M）の関数として平均遅延時間および血餅の大きさをプロットした（図 7 8）。曲線適合により計算された最大半減の影響は、両パラメータにおいて約 0.7 n M であった。

30

【0374】

図 7 9 は、血友病 A 血漿のみ、3 0 0 n M A R C 1 9 4 9 9 を有する血友病 A 血漿、または 3 0 n M r V I I a を有する血友病 A 血漿についての凝固パラメータを比較する。図 7 9 A ~ D は、それぞれ、遅延時間、初期血餅成長速度、定常速度、および 6 0 分後の血餅の大きさを示す。r V I I a とは対照的に、A R C 1 9 4 9 9 は、遅延時間を短縮し、初期速度を増加させることにより、最初に血餅の大きさを増加させ、これは、空間的増殖段階（V_{定常}）に影響を与えなかった。

40

【0375】

T F P I が枯渇した血漿における低 T F 密度での実験も実行し、A R C 1 9 4 9 9 の作用機序および T F P I による空間的凝固の調節に関する識見を得た。凍結乾燥した T F P I が枯渇した血漿を A m e r i c a n D i a g n o s t i c a から購入し、脱イオン水中で再懸濁し、C T I を 0.2 m g / m L 添加した。組換え T F P I（r T F P I、R & D S y s t e m s）を、空間的血栓形成の測定のために、低 T F 表面密度の存在下で、0 または 1 0 n M の濃度の A R C 1 9 4 9 9 を有する血漿または A R C 1 9 4 9 9 を有さない血漿（0 または 3 0 0 n M）中に添加した。r T F P I の添加は、A R C 1 9 4 9 9 の不在下において遅延時間（図 8 0）を著しく増加させたが、3 0 0 n M A R C 1 9 4 9

50

9の存在下では影響を与えず、このことは、これが完全に阻害されたことを示唆した。ARC19499は、補充的rTFPIの不在下ではTFPIが枯渇した血漿中の凝固に影響を与えず、このことは、その影響はTFPIに特異的であることを示唆する。rTFPIもARC19499も、本実験において初期速度にいかなる影響も与えなかった。

【0376】

結論として、ARC19499は、低TF密度($1 \sim 3 \text{ pmol e/m}^2$)で、空間的に不均一な系において、正常な血漿および血友病A血漿中の凝固を著しく改善した。遅延時間が短縮され、空間的増殖の初期速度および60分時点での血餅の大きさがARC19499の最大2倍に増加し、活性化因子どころか空間的増殖速度にほとんど影響を与えなかった。血友病A血漿において、このことが延時間および初期速度パラメータの完全なる正常化をもたらした一方で、60分時点での血餅の大きさは、部分的に正常化された(ARC19499の添加時に正常な血漿の30%~60%増加)。TF密度の増加を伴って、アプタマーの影響は小さくなり、TFが 20 pmol e/m^2 を超えた時点での影響はほとんどなかった。低TF密度での本実験における凝固へのARC19499の作用は、ARC19499がTFPIを欠乏した血漿中の凝固に影響を与えなかったため、TFPIに特異的であった。

10

【0377】

実施例24

本実施例は、全血および無細胞(血漿)凝固時間アッセイにおいて、ARC19499が血友病A患者および血友病B患者から収集された試料中の凝固を改善することができることを実証する。

20

【0378】

血液試料(20mL)を、7人の重度の血友病A対象(対象番号1、3、5、8、10、11、および12)、2人の重度の血友病B対象(対象番号4および9)、ならびに3人の健常な対照(対象番号2、6、および7)を含む12人の対象から収集した。血液を、0.5mM EDTAおよび0.1mg/mLトウモロコシトリプシン阻害剤(CTI、Haematologic Technologies Inc.)内に収集した。各試料の約半分を全血アッセイで使用した一方で、残りの半分を遠心分離して、乏血小板血漿(PPP)を調製した。

30

【0379】

TF活性凝固時間(TF-ACT)は、未分画ヘパリンおよびプロタミンへの患者の応答を測定するための一般的に用いられているシステムである、Hemochron(登録商標)Response Whole Blood Coagulation System(International Technidyne Corp.)を用いて実行した全血アッセイである。この機器で測定される標準ACTは、凝固の「接触」または「内因性」経路の活性化因子(例えば、セリットまたはカオリン)を含有するチューブを使用する。しかしながら、TF-ACTのために、標準ACTを測定するために設計されるチューブを接触活性化試薬ですすいだ。その中に、 $12 \mu\text{L}$ の 1 M CaCl_2 、所望の量のARC19499、および $2 \mu\text{L}$ の 5 nM 再脂質化組換えTF(Haematologic Technologies)を添加した。この混合物への2mLの全血の添加時に、凝固時間を標準ACTに関してHemochron(登録商標)Response機器上で測定した。結果は、図81の表様式で示される。 335 ± 22 秒の平均ベースラインTF-ACTが正常な対象において観察された。凝血促進効果を示唆するTF-ACTの適度な減少(最大75秒)が、 $44 \sim 700 \text{ nM}$ に及ぶARC19499濃度でこれらの個人において観察された。2人の血友病B対象は、528秒および580秒のベースラインTF-ACTを示した。これらの2人の個人において、TF-ACTは 88 nM ARC19499で $160 \sim 205$ 秒減少し、それから、より高いARC19499濃度(最大 350 nM)で適度に増加した。比較的広い範囲のベースラインTF-ACT値が血友病A群において観察され、平均値は 578 ± 140 秒であった。ARC19499に依存したTF-ACTの大幅な短縮がこれらの個人の7人中6人に観察され、このうち2人(

40

50

対象番号1および11)において、正常な範囲以下の値が観察された。最大47秒の適度な減少のみ対象番号12で観察されたが、この対象は、群内で最短の試験ベースラインTFPI抑制が、単純な全血凝固アッセイにおいて凝固活性を改善することができたことを示唆する。

【0380】

希釈プロトロンビン時間(dPT)アッセイを、TFPIアッセイに関して説明される血液試料と同一の血液試料から調製されたPPP上で実行した。標準プロトロンビン時間(PT)を、組織因子(約1nM)、塩化カルシウム、およびリン脂質から成るトロンボプラスチンを、血漿に添加することにより実行し、凝固の「組織因子」または「外因性」経路の完全性を評価する。標準PTプロトコルを用いて測定される正常な血漿試料における凝固時間は、典型的には約11秒である。PTは、ワルファリンへの患者の応答を測定するために一般的に使用されており、FVIIおよびFIXのような接触経路因子の欠乏に対して非常に鈍感である。標準PTとは対照的に、dPTは、非常に低いTF濃度を使用し、本アッセイで測定される凝固時間は、TFおよび接触経路の両方の因子に敏感である。この特定の実験において、トロンボプラスチン試薬(Innovin、Dade-Behring)を、トリス緩衝生理食塩水(20mMトリス、pH7.5、150mM NaCl)中に希釈し、0.3pMのTF濃度に達した。120μLのPPPを60μLの希釈TF溶液と混合することによりdPTを実行し、60μLの25mM CaCl₂を血漿/TF混合物に添加する前に、37℃で3分間インキュベートした。凝固時間をACL-8000凝固計(Instrumentation Laboratory, Bedford, MAから)上で記録し、全ての対象に関するデータが図82に表様式で示される。全ての正常な対象および血友病B対象、ならびに7人中6人の血友病A対象由来のPPP試料のベースライン凝固時間は360秒超であり、それは、凝固計上で事前に設定した最大の測定可能な凝固時間であった。1人の血友病A対象(番号10)は、169秒のベースラインdPTを示した。PPPに添加した増加した濃度のARC19499は、典型的には、dPT凝固時間の減少をもたらした。正常な対象由来のPPPにおいて、2nM ARC19499は、ベースラインに対して凝固時間(平均=278±15秒)を著しく低下させるのに十分であったが、血友病A対象または血友病B対象由来の血漿において明らかな影響はなかった。しかしながら、8nM ARC19499は、ほぼ全ての対象由来のPPPにおける凝固時間を低下させた。低いベースラインdPTが観察された対象番号10、およびARC19499に対して非応答性であるように見えた対象番号12由来のPPPにおいて例外が観察された。これらの2人の個人を除いて、8nM ARC19499についての血友病A群の平均凝固時間は188±8秒であった。同一の条件下における正常な群および血友病B群の平均凝固時間は、それぞれ、204±37秒および226±22秒であった。より高い濃度のARC19499は、適度な凝固時間のさらなる減少のみを引き起こした。正常な群、血友病A(番号10および番号12を除く)群、ならびに血友病B群の500nM ARC19499での平均凝固時間は、それぞれ、179±6秒、200±21秒、および161±3秒であった。これらのデータは、ARC19499によるTFPI抑制が、単純な血漿に基づく凝固アッセイにおいて凝固活性を改善することができることを示唆する。

【0381】

実施例25

本実施例は、回転式トロンボエラストメトリー(ROTEM)で測定されるように、ARC19499が、血友病A患者および血友病B患者由来の全血試料中の凝固を改善することができることを実証する。

【0382】

血液試料を、39人の健常な志願者(男性27人および女性12人)ならびに40人の血友病患者(全て男性)から収集した。40人の血友病患者のうち、3人の血友病B(HB)患者および28人の血友病A(HA)患者は、重度(1%未満のベースライン因子活性

）であると診断され、1人のHA患者および1人のHB患者は、中程度の血友病（1～5%のベースライン因子活性）に罹患しており、4人のHA患者および2人のHB患者が軽度の血友病（5%超のベースライン因子活性）を有した。21ゲージの翼状針を用いて、血液試料を、1：9の体積比で3.8%クエン酸ナトリウムを含有するプラスチックのVacuetteチューブ（Greiner Bio-One）内に注いだ。

【0383】

凝固を、初代のトロンボエラストグラフィシステム（TEG（商標））に基づくROTEM（Pentapharm GmbH）で分析した。典型的なROTEM実験では、血液を加熱したカップ内で、37℃でインキュベートする。フィブリンがカップとピンとの間に形成される時に、ピンの回転が検出されてトレースが生成され、このことは、経時的血栓形成を示唆する。以下のパラメータ：凝固時間（CT）、血栓形成時間（CFT）、最大血餅硬度（MCF）、およびアルファ角度（アルファ）を、ROTEMのトレースから分析することができる。凝固時間（CT）は、分析の開始から血餅の開始までの期間を特徴付ける。血栓形成時間（CFT）は、20mmの振幅に達するまでのその後の期間を特徴付ける。アルファ角度を、2mmの振幅点を通る曲線に対する中心線と接線との間の角度で得る。CFTおよびアルファ角度の両方ともに、血栓の発達の速度を示す。MCFは、ROTEMのトレースの最大振幅から計算され、血餅の安定性および強さを描写し、MCFは、フィブリノーゲンおよび血小板機能によって大きく左右される。

【0384】

この一式の実験において、300μLのARC19499を混ぜた全血（0、0.2、0.6、2、6、20、60、200、または600nM ARC19499）を、予熱したプラスチックカップに移した。血液試料を20μLの0.2M CaCl₂を用いて再石灰化し、凝固を約33fMの組織因子（TF）（Innovin, Dade Behring、1：200、000で希釈）で活性化した。全ての分析を37℃で実行した。測定を、トウモロコシトリプシン阻害剤（CTI）なし、または100μg/mLのCTI（Haematologic Technologies Inc）を伴ってのいずれかで実行した。測定したパラメータのうちのいずれかのARC19499の異なる濃度の間の比較を、Bonferroni Correctionを用いてWilcoxon符号付き順位検定で計算した。健常な対照を患者と比較するために、Mann-Whitney U-試験を用いた。第FVII因子（FVII）活性に対する止血パラメータの相関関係を分析するために、Spearmanの順位相関係数を用いた。0.05以下のp値を、統計的に有意であると見なした。

【0385】

血友病患者のベースライン全血凝固特性は、健常な対照（全てp0.01未満）と比較して、CTIの不在下において、（延長されたCTで示される）延長された開始期ならびに減少した全血凝固の増殖段階（延長されたCFTおよびより小さいアルファ角度）を特徴とした（図83）。

【0386】

2nM以上のARC19499の濃度は、血友病患者および健常な対照（p0.01未満）の両方において、全血凝固を著しく強化した。ARC19499の最大止血効果を、60nM以上の濃度で得た。血友病の血液において、ARC19499はCFTを減少させ、アルファ角度を健常な対照（p0.4超）のアルファ角度に等しい値まで増加させた。凝固時間はARC19499により実質的に改善されたが、完全に正常化されなかった。MCFは、対照と患者との間で著しくは異ならないが、ARC19499によって著しく増加した（血友病患者の2nM以上、および健常な対照の200nMと比較して、0nM ARC19499においてp0.05未満）。

【0387】

血友病A患者試料中のFVII凝固剤活性（FVII：C）活性レベルとベースラインCTとの間の比較は、有意な相関関係を示唆した（p0.01未満）。したがって、血友病A患者のCTデータを、3つの群（1%未満のFVII：C、1～5%のFVII

I : C、および5%超のFV I I I : C)に階級化し、健常な対照のC Tデータの次に再プロットした(図84)。先に示唆したように、2 n M以上の濃度のA R C 1 9 4 9 9は、凝固時間を著しく短縮した(p 0 . 0 1未満)。血友病患者および健常な対照のC T値は著しく異なるままであったが(p 0 . 0 5未満)、A R C 1 9 4 9 9は、ベースライン値と比較して、血友病患者のC Tを最大で38%まで、健常な対照のC Tを最大で19%まで短縮した。測定された1%未満のFV I I I : Cを有する患者において、A R C 1 9 4 9 9がC Tに最も影響を与えた。1%未満のFV I I I : Cを有する患者のC Tは完全に正常化されなかったが、A R C 1 9 4 9 9は、健常な対照の範囲および5%超のFV I I I : Cを有する患者の値に等しい値にC Tを短縮した。

【0388】

28人の血友病患者および11人の健常な男性対照由来の試料を用いて、さらなるR O T E M分析をC T Iを含有する血液において実行した。この場合もやはり、凝固特性は、M C Fを除く全てのパラメータにおいて、患者と健常な対照(p 0 . 0 1未満)では著しく異なった(図85)。C T Iの不在下での測定に類似して、C T Iを含有する血液へのA R C 1 9 4 9 9の添加は、C TおよびC F Tを著しく短縮し、アルファ角度およびM C F(濃度20 n M以上、p 0 . 0 1以下)を上昇させた。C T Iを含有する血液において、前止血効果は、C T Iを有さない血液よりも顕著であった。C T Iを含有する血液への200 n MのA R C 1 9 4 9 9の添加時に、C Tが著しく短縮されただけでなく(p 0 . 0 1未満)、もはや健常な対照のベースラインC Tとは異ならなかった(p = 0 . 0 6)。A R C 1 9 4 9 9は、全血を欠乏するC T Iで事前に観察されたように、C F TおよびC T I全血のアルファ角度も正常化した。60 n M以上のA R C 1 9 4 9 9と混ぜた血友病の血液のR O T E Mパラメータは、健常な対照のベースライン値と等しかった(p 0 . 1超)。

【0389】

後天性血友病Aを有する1人の患者を採用した。この患者は、7%のFV I I I : C活性、8.5 B U / m LのFV I I I 阻害剤、および63秒上昇したa P T Tを示した。この患者は、2回のFV I I I バイパス活性(F E I B A)の注入を受け、最も最近の注入は静脈穿刺の8時間以内であった。結果として、この患者のC TおよびC F Tは、すでに正常であった(患者値: C T = 496秒、C F T = 213秒、健常な対照の平均値: C T = 607秒、C F T = 251秒)。A R C 1 9 4 9 9は、対照および遺伝性血友病患者よりもC TおよびC F Tをさらに短縮した(C T : 19%および30%に対して47%、C F T : 38%および22%に対して45%)。A R C 1 9 4 9 9は、図86に示されるように、アルファ角度も増加させた。

【0390】

後天性血友病を有する患者は極めてまれであるため、R O T E M実験を、FV I I I に対する中和抗体で処理された正常な血液上で繰り返した。健常な対照由来の血液を、ヒッジ抗ヒトFV I I I 多クローン性抗体(特定の活性2300 B U / m g、H a e m a t o l o g i c T e c h n o l o g i e s I n c)で事前にインキュベートした。図87は、同一の対照におけるC T(左パネル)およびC F T(右パネル)を示し、それぞれのグラフの左側に、FV I I I 抗体による阻害後の値が示される。60 n M A R C 1 9 4 9 9の添加は、抗体で処理された血液のC TおよびC F Tの両方を正常化した。

【0391】

これらのデータは、R O T E Mで測定されるように、A R C 1 9 4 9 9が、健常な対照および血友病患者由来の血液試料中の凝固に凝固促進効果を与えたことを示す。さらに、A R C 1 9 4 9 9は、血友病患者由来の血液におけるR O T E M凝固パラメータを正常化することができた。

【0392】

実施例 26

本実施例は、校正自動トロンボグラフィー(C A T)で測定されるように、A R C 1 9 4 9 9が、血友病A患者および血友病B患者由来の血漿試料中のトロンビン生成を改善する

10

20

30

40

50

ことができることを実証する。

【0393】

血液試料を39人の健常な志願者（男性27人および女性12人）ならびに40人の血友病患者（全て男性）から収集した。40人の血友病患者のうち、3人の血友病B（HB）患者および28人の血友病A（HA）患者は、重度（1%未満のベースライン因子活性）であると診断され、1人のHA患者および1人のHB患者は、中程度の血友病（1～5%のベースライン因子活性）に罹患しており、4人のHA患者および2人のHB患者が軽度の血友病（5%超のベースライン因子活性）を有した。21ゲージの翼状針を用いて、血液試料を、1：9の体積比で3.8%クエン酸ナトリウムを含有するプラスチックのVacuetteチューブ（Greiner Bio-One）内に注いだ。乏血小板血漿（PPP）を、2段階の室温での遠心分離ステップ、すなわち、 $1700 \times g$ で10分間の第1の回転、その後、 $18,000 \times g$ で15分間の第2の回転により、これらの試料から調製した。 $100 \mu g/mL$ のトウモロコシトリプシン阻害剤（CTI、Haematologic Technologies Inc.）を含有するPPPを、アッセイで用いるために、異なる濃度のARC19499（0、0.2、0.6、2、6、20、60、200、または600 nM ARC19499）と混ぜた。

10

【0394】

96ウェルのマイクロタイタープレート中に、 $80 \mu L$ のPPPを、 $20 \mu L$ の組織因子（TF）およびリン脂質の混合物（PPP-Reagent Low, Thrombinoscope BV）に添加することにより、CATアッセイを実行した。TFおよびリン脂質の最終濃度は、それぞれ、1 pMおよび $4 \mu M$ であった。 $20 \mu L$ の蛍光基質（FluCa Kit, Thrombinoscope BV）を添加することにより反応を開始し、Fluoroskan Ascent 蛍光光度計（Thermo Fisher Scientific）を用いて蛍光性を検出した。Thrombinoscopeソフトウェアによる分析は、y軸にトロンビン（nM）、およびx軸に時間（分間）を有するトロンビン生成曲線をもたらした。ソフトウェアは、遅延時間（分、最初のトロンビン生成の開始までの時間）、内因性トロンビン生成能（ETP、nM、トロンビン生成曲線下面積）、ピークトロンビン（nM、アッセイの任意のある時点で生成された最高量のトロンビン）、ピークまでの時間（分、ピークトロンビン濃度に達するまでの時間）、およびスタートテール（分、トロンビン生成の終了に達する時点）を含む、いくつかのパラメータの値を決定した。測定したパラメータのうちのいずれかの異なる濃度のARC19499の間の比較を、Bonferroni Correctionを用いてWilcoxon符号付き順位検定で計算した。健常な対照を患者と比較するために、Mann-Whitney U試験を使用した。0.05以下のp値を、統計的に有意であると見なした。

20

30

【0395】

200 nMのARC19499の存在下および不在下でのトロンビン生成と比較した、代表的な血友病A患者（左パネル）および健常な対照（右パネル）のCATデータの例が図88に示される。ARC19499の添加は、血友病A患者試料におけるトロンビン生成曲線を正常化し、健常な対照試料におけるトロンビン生成を増加させた。

【0396】

全ての血友病患者および健常な男性対照についての平均CATパラメータが図89に示される。ベースラインにおいて、血友病患者群は、延長されたピークまでの時間、より低いピークトロンビン生成、および大幅に損なわれたETPを示した。ARC19499の不在下において、以下のCATパラメータ：ピークまでの時間、ピークトロンビン生成、ETP、およびスタートテールは、健常な男性対照と血友病患者との間で著しく異なった（ $p0.001$ 未満）。健常な対照と血友病患者との間に遅延時間における有意な差異はなかった（図90）。ARC19499の添加は、CATアッセイによって評価されたパラメータの全てを著しくを高めた（図89および図90）。60 nMを超える濃度のARC19499は、血友病患者のCATパラメータを正常化した。以下のCATパラメータ：スタートテール、ピークまでの時間、およびETPにおいて、健常な対照のベースライン

40

50

値と、60 nM以上のARC19499を添加して測定された血友病患者の値との間にもはや有意な差異はなかった（ $p < 0.05$ ）（図89）。患者と対照との間のピークトロンビン生成は著しく異なるままであったが、600 nMのARC19499は、血友病患者のピークトロンビン生成をベースラインにおいて47 nMから135 nMに185%増加させ、したがって、健常な対照の正常な範囲に達した（健常な対照の平均ピークトロンビン167 nM、最小100 nM、最大297 nM）。ARC19499は、両群において遅延時間を著しく短縮したが（0.6 nMを超える濃度に対して $p < 0.001$ 未満）、それらの群の間の差異は、引き続き有意ではなかった（図90）。

【0397】

図91は、ピークトロンビンデータを3つの群（1%未満のFVII:C、10 1~5%のFVII:C、および5%超のFVII:C）に階級化し、健常な対照ピークトロンビンデータの次に再プロットしたピークトロンビンデータを示す。増加した濃度のARC19499は、4つ全ての群においてピークトロンビン生成を増加させた。ARC19499は、ベースラインの平均の健常な対照値と比較して、1%未満のFVII:C血漿においてピークトロンビン生成を完全に正常化しなかったが、60 nM以上の値のARC19499で、5%超のFVII:C濃度を有する患者のベースラインよりも高いベースラインおよび健常な対照において観察された値の範囲内（図91の斜線領域）に達した。

【0398】

CATアッセイを、後天性血友病を有する患者由来のARC19499を混ぜた試料上でも実行した。この患者は、7%のFVII:C活性、8.5 BU/mL FVII阻害剤、および63秒上昇したaPTTを示した。この患者は、2回のFVIIバイパス活性（FEIBA）の注入を受け、最も最近の注入は静脈穿刺の8時間以内であった。結果として、この患者の凝固のROTEMパラメータは、すでに正常であった（患者値：CT=496秒、CFT=213秒、健常な対照の平均値：CT=607秒、CFT=251秒）。0、2、20、および200 nM ARC19499の存在下で測定されたトリロンビン生成曲線が図92に示される。この患者は正常なROTEM値を示したが、ベースラインCAT値は大幅に損なわれた。遺伝性血友病を有する患者に関して、増加した濃度のARC19499は、この患者由来の試料中のトリロンビン生成を正常化した。ARC19499は、ピークトロンビンおよび患者のETPに最も影響したが、それらの両方とも 30に2.5倍以上増加した。ピークトロンビンを正常化した（ピークトロンビン：ベースライン54 nM~最大165 nM、健常な対照の平均ベースライン値：164 nM）。さらに、ARC19499（200 nM）は、ETPを健常な対照の値を上回った値に増加させた（ETP：ベースライン973 nM~最大2577 nM、健常な対照の平均ベースライン：ETP1322 nM）。

【0399】

CAT実験をFVIIに対する中和抗体で処理された正常な血漿上で繰り返した。健常な対照由来のPPPを、ヒッジ抗ヒトFVII多クローン性抗体（特定の活性2300 BU/mg、Haematologic Technologies Inc）で事前にインキュベートした。図93は、同一の対照におけるETP（左パネル）およびピークトロンビン（右パネル）を示し、それぞれのグラフの左側に、FVII抗体による阻害後の値が示される。60 nM ARC19499の添加は、抗体で処理された血漿におけるETPおよびピークトロンビンの両方を正常化した。

【0400】

これらのデータは、CATで測定されるように、ARC19499が、健常な対照および血友病患者由来の血液試料中のトリロンビン生成に凝固促進効果を与えたことを示す。さらに、ARC19499は、血友病患者由来の血漿におけるCATパラメータを正常化することができた。

【0401】

実施例 27

10

20

30

40

50

本実施例は、自動校正トロンビン生成 (CAT) で測定されるように、ARC19499 が、重度、中程度、および軽度の血友病 A 患者、ならびに重度の血友病 B 患者由来の血漿試料中のトロンビン生成時間 (TGT) を改善することができることを実証する。

【0402】

血液を、3.2% クエン酸ナトリウムおよび 250 μ L の 1.3 mg/mL トウモロコシトリプシン阻害剤 (CTI) を含有する 3.2 mL の Vacuette チューブ内に収集し、最終 CTI 濃度は 100 μ g/mL であった。試料を、重度 (1% 未満の FVII、n=10)、中程度 (1~5% の FVII、n=7)、および軽度 (5~40% の FVII、n=5) 血友病 A を有する患者、重度の血友病 B (1% 未満の FIX、n=5) を有する患者、ならびに健常な志願者 (n=10) から収集した。CAT アッセイ用の 10 乏血小板血漿 (PPP) を調製するために、チューブを 2500 $\times$ g で 15 分間遠心分離し、上清を新鮮な Eppendorf チューブに移し、その後、11000 $\times$ g で 5 分間遠心分離した。血漿をすぐに使用するか、あるいは後に使用するために -80 $^{\circ}$ C で凍結させるかのいずれかを行った。トロンビン生成への ARC19499 の影響を分析するために、ARC19499 を、10、100、300、1000、3000、または 10,000 ng/mL (0.9、9.0、27.1、90.3、271、または 903 nM) の濃度で血漿に添加した。

【0403】

トロンビン生成時間 (TGT) アッセイを、Thrombinoscope ソフトウェアバージョン 2.6 でプログラム化された Thermo Scientific Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer (シリアル番号 374-90031C) から成る Thrombinoscope 機器 (Thrombinoscope, Maastricht, The Netherlands) 上で、校正自動トロンボグラフィー (CAT) により実行した。80 μ L の血漿を、20 μ L の再脂質化された組換え組織因子 (TF、最終濃度 1 pM) と混合し、20 μ L の Fluc 基質の添加によりアッセイを開始した。Thrombinoscope ソフトウェアによるデータの分析は、y 軸上にトロンビン (nM) および x 軸上に時間 (分間) を有するトロンビン生成曲線をもたらした。ソフトウェアは、遅延時間 (分、最初のトロンビン生成の開始までの時間)、内因性トロンビン生成能 (ETP、nM、トロンビン生成曲線下面積)、ピークトロンビン (nM、アッセイの任意のある時点で生成された最高量のトロンビン)、およびピークまでの時間 (分、ピークトロンビン濃度に達するまでの時間) を含む、いくつかのパラメータの値を決定した。全ての測定を二重に実行した。各群の平均における差異を、必要に応じて、スチューデント t 検定または ANOVA を用いて試験した。

【0404】

図 94~97 は、健常な志願者 (HV)、重度の血友病 A を有する患者 (SHA)、中程度の血友病 A を有する患者 (MoHA)、および軽度の血友病 A を有する患者 (MiHA) からの代表的な CAT データを示す。新たに処理された血漿で実行した実験での健常な志願者、全ての 3 つの血友病 A 患者群、および重度の血友病 B 患者群の平均データは、図 98 に示される。ベースライン ETP およびピークトロンビンパラメータは、健常な対照と比較して、全ての血友病患者群において減少し、ピークまでの時間は増加した。ベースラインパラメータ値が 3 つの血友病 A 患者群の間で本質的に区別不能であったため、FVII 欠乏の重症度は、観察されたトロンビン生成に影響を与えなかった。FVII 欠乏は、健常な対照と比較して、ベースライン遅延時間にほとんど影響を与えなかったが、FIX 欠乏は、ベースラインで約 2 倍の遅延時間の延長をもたらした。同様の CAT パラメータ値が凍結融解を経た血漿試料において観察されたため、血漿の凍結は、トロンビン生成にほとんど影響を与えなかった (図 99)。

【0405】

個別のデータプロット (図 95~97) ならびに平均データプロット (図 98 および 図 99) に示されるように、ARC19499 の添加は、血友病血漿中のトロンビン生成を改

善した。ETPは、最大10,000 ng/mL (903 nM)の増加した濃度のARC19499とともに増加し、全ての血友病群において正常なレベルに達した(図98および図99)。改善への傾向もピークトロンビンにおいて観察された。このパラメータの正常化が達成されなかったが、3～5倍の改善が全ての患者群において観察された。ARC19499は、いずれの血友病A患者群においても遅延時間にほとんど影響を与えなかったが、血友病B由来の血漿における遅延時間をわずかに改善した。ピークまでの時間のわずかな改善も、患者群の全てにおいて観察された。健常な志願者の血漿において、ARC19499の添加は、いずれのCATパラメータにもほとんど影響を与えなかった。

【0406】

以下の表：表3. 重度の血友病A (SHA)、表4. 中程度の血友病A (MoHA)、表5. 軽度の血友病A (MiHA)、表6. 重度の血友病B (SHB)、および表7. 正常群における新鮮な血漿および凍結血漿についての平均CATデータが、四分位範囲で示される。総合すると、データは、ARC19499が、全ての重症度レベルの血友病A患者の血漿、および重度の血友病B血漿中のトロンビン生成を改善したことを示す。

【表3-1】

表3：CTIを有するクエン酸PPPにおけるTGT-SHA (n=10)

ARC19499 ng/mL	ETP[nM/分]				ピーク[nM]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	1347	1260 ～ 1538	1587	1244～ 1763	88	63～ 119	107	86～ 139
3000	1233	1117 ～ 1425	1569	1094～ 1716	76	56～ 103	103	77～ 132
1000	1171	1019 ～ 1335	1546	1019～ 1711	71	50～95	90	67～ 125
300	1078	825～ 1206	1522	916～ 1657	60	44～77	83	58～ 117
100	896	741～ 1137	1206	726～ 1469	46	36～76	58	42～ 94
10	638	564～ 978	705	516～ 1169	34	23～48	31	19～ 62
0	489	292～ 711	685	247～ 847	21	13～29	26	10～ 35

【表 3 - 2】

ARC19499 ng/mL	遅延時間[分]				TT ピーク[分]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	3.3	3.2～ 4.2	3.5	2.9～ 3.8	10.1	8.6～ 12.1	10.6	9.1～ 13.0
3000	3.3	3.2～ 3.7	3.5	2.6～ 4.1	10.1	9.6～ 11.7	11.5	9.3～ 13.0
1000	3.3	3.24 ～3.8	3.6	3.0～ 3.8	11	9.6～ 11.7	9.9	9.4～ 11.4
300	3.4	3.3～ 3.8	3.7	2.9～ 4.0	10.1	9.5～ 12.5	11.3	9.9～ 11.9
100	3.3	2.5～ 3.7	3.6	3.0～ 4.2	10.5	9.3～ 12.3	11.9	10.8～ 12.7
10	3.3	3.0～ 3.5	3.3	2.5～4	10.6	9.3～ 13.6	11.8	9.2～ 14.1
0	3.6	3.4～ 4.3	4.1	3.6～ 5.7	17.8	16.2～ 22.9	22.5	15.5～ 24.8

10

20

【表 4 - 1】

表 4 : C T I を有するクエン酸 P P P における T G T - M o H A (n = 7)

ARC19499 ng/mL	ETP[nM/分]				ピーク [nM]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	1548	1468 ～ 1672	1706	1406～ 2062	102.71	86～ 134	97	87～ 133
3000	1498	1331 ～ 1538	1637	1188～ 2054	99.39	68～ 130	94	88～ 130
1000	1366	1235 ～ 1603	1589	1212～ 2058	88.92	58～ 134	86	80～ 126
300	1314.5	965～ 1781	1349	1099～ 1762	81.25	57～90	81	68～ 108
100	919	835～ 1792	1085	939～ 1763	58.77	48～85	74	51～ 100
10	806	576～ 1102	796	740～ 1308	49.19	27～60	47	34～87
0	517.9	384～ 872	764	392～ 1105	22.62	16～42	41	16～64

10

20

30

【表 4 - 2】

ARC19499 ng/ml	遅延時間[分]				TT ピーク[分]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	4	3.5～ 4.8	5.1	4.0～ 5.6	12.7	10.5～ 13.6	12.8	11.3～ 14.7
3000	4.2	4.0～ 4.8	5	3.3～ 5.5	12.5	10.3～ 13.4	12.6	11.3～ 13.1
1000	4.2	4.8～ 5.8	5.8	4.6～ 6.0	12.3	10.5～ 12.6	12.4	11.3～ 14.1
300	4.1	3.6～ 4.3	3.8	3～ 5.33	11.2	10.3～ 13.3	11.0	9.5～ 12.2
100	4.2	3.5～ 4.7	4.8	3.3～ 5.5	11.0	10.8～ 13.3	11.5	10～ 14.1
10	4.5	3.6～ 4.6	4.6	3.3～ 6.0	13.7	10.5～ 14.6	12.2	11.3～ 14.6
0	4.8	4～ 5.8.9	5.0	4.2～7	16.4	15～ 2.3	15.5	13.5～ 16.8

10

20

【表 5 - 1】

表 5 : C T I を有するクエン酸 P P P における T G T - 軽度の H A P P P (n = 5)

ARC19499 ng/ml	ETP[nM/分]				ピーク [nM]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	1366	1081 ～ 1472	1361	1271 ～ 1708	93	75～ 138	98	87～ 112
3000	1187	913 ～ 1412	1273	1226 ～ 1520	87	65～ 116	81	72～ 97
1000	1097	871 ～ 1398	1245	1156 ～ 1330	82	62～ 102	77	72～ 88
300	1069	804 ～ 1317	1136	1026 ～ 1201	78	54～ 80	69	59～ 76
100	986	643 ～ 1149	1045	753～ 1145	62	37～ 77	61	40～ 67
10	709	421 ～ 1000	692	551～ 1068	42	19～ 52	39	25～ 58
0	532	337 ～ 823	493	372～ 800	28	14～ 37	25	16～ 41

10

20

30

【表 5 - 2】

ARC19499 ng/ml	遅延時間[分]				TT ピーク[分]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	4	2.4 ～ 5.2	3.6	3～ 5.6	9.6	8～ 11.5	10.5	9.3～ 13.5
3000	4.1	2.1 ～ 5.1	3.3	2.3～ 5.7	9.8	8.8～ 11.5	10.3	9～ 12.4
1000	4.1	3～ 5.2	3.6	3.2～ 5.7	10.1	9～ 11.7	10.1	9.6～ 12.6
300	4	3.2 ～ 5.1	3.6	3.42 ～5.5	10.6	9.3～ 11.8	11	10.3～ 13.1
100	4.7	3.1 ～ 5.5	4.3	3.3～ 5.5	10.8	9.2～ 16.4	10.6	10.1～ 14.3
10	4.1	2.3 ～6	3.6	2.6～ 6.5	11.6	11.5～ 17.1	11.6	10.7～ 17.5
0	4.8	2.5 ～ 8.9	4.6	3.9～ 10.4	15.6	14.0～ 22.1	15.6	13.1～ 24.5

10

20

30

【表 6 - 1】

表 6 : C T I を有するクエン酸 P P P における T G T - S H B P P P (n = 5)

ARC19499 ng/ml	ETP[nM/分]				ピーク [nM]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	1484	1129～ 1592	1736	1312 ～ 1850	74.3	70.5～ 117	106.1	77～ 122
3000	1360.7	1074～ 1459	1635	1229 ～ 1702	70.5	59～ 102	97.9	75～ 111
1000	1217.5	949～ 1435	1587.5	1200 ～ 1667	68.4	57.1～ 98.2	94.6	74～ 107
300	1167	893～ 1353	1429	999～ 1493	62.1	53.5～ 97.2	74.3	61～ 104
100	1075	671～ 1228	1154.5	850～ 1340	58.5	40.7～ 85	60.1	50～ 92
10	787.5	431～ 852	794.9	550～ 981	40	21.7～ 46.6	41	32～ 64
0	403	186～ 473	642	189～ 722	14.9	9.2～ 25.5	29.3	9～ 35

10

20

30

【表 6 - 2】

ARC19499 ng/ml	遅延時間[分]				TT ピーク[分]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	6	4.7 ～ 6.3	5.3	4.9～ 6.4	12	11.3～ 14.8	13.7	12～ 14.5
3000	6	4.7 ～6	5.3	5～5.7	13.3	10.9～ 15.7	12.7	11.8～ 4.3
1000	5.3	4.6 ～ 6.3	5.5	4.5～ 6.5	12	10.1～ 14.6	12.3	11.4～ 4.4
300	5.5	4.9 ～ 5.9	5.7	5.3～ 5.8	12.7	9.8～ 14.5	12	11～ 13.8
100	5.3	4.7 ～ 6.2	5.5	5.1～6	12.3	9.9～ 15.1	12.5	10.9～ 3.7
10	5.7	4.9 ～ 6.8	5.3	5.1～ 6.5	12.7	11.1～ 19.7	13.3	11.2～ 4.3
0	7.8	6.4 ～ 9.6	7.2	5.8～ 8.8	19.8	14.2～ 23.4	16.7	14.6～ 8.8

10

20

30

【表 7 - 1】

表 7 : C T I を有するクエン酸 P P P における T G T - 正常な P P P (n = 1 0)

ARC19499 ng/ml	ETP[nM/分]				ピーク[nM]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	1696	1464 ～ 2286	2018	1455 ～ 2395	257	227～ 286	265	197～ 274
3000	1903	1788 ～ 2424	1897	1746 ～ 2356	245	205～ 270	261	210～ 272
1000	1680	1545 ～ 2072	1901	1283 ～ 2374	227	188～ 290	229	182～ 263
300	1964	1533 ～ 2245	1903	1548 ～ 2245	225	199～ 245	217	183～ 288
100	1973	1529 ～ 2231	1730	1512 ～ 2266	230	200～ 238	230	189～ 287
10	2087	1530 ～ 2125	2092	1611 ～ 2189	239	204～ 274	220	204～ 269
0	1847	1517 ～ 2329	2159	1745 ～ 2462	192	161～ 298	241	182～ 300

10

20

30

【表 7 - 2】

ARC19499 ng/ml	遅延時間[分]				TT ピーク[分]			
	新鮮		凍結		新鮮		凍結	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	4.3	3.7 ～ 4.6	3.4	3～3.5	7.9	6.7～ 8.9	8.1	7.2～ 9.4
3000	3.8	3.6 ～ 4.5	3.3	3.1～ 3.9	7.9	7.5～ 8.8	7.9	7.5～ 8.4
1000	4	3.5 ～ 4.6	3.5	3.3～ 3.9	8	7.7～9	7.0	7.4～ 8.7
300	4	3.5 ～ 4.7	3.5	3.2～ 3.9	8.3	7.9～ 9.3	8.2	7.3～9
100	3.9	3.3 ～ 4.4	3.5	3.1～ 3.9	8.7	7.9～ 8.9	8.5	6～ 10.3
10	3.7	3.4 ～ 5.1	4	3.2～5	9	7.9～ 10.8	9.1	7.2～ 10
0	4.5	3.7 ～ 4.6	3.8	3.2～ 4.7	9.5	7.1～ 10.4	9.2	7.5～ 9.9

10

20

30

【 0 4 0 7】

実施例 2 8

本実施例は、トロンボエラストグラフィー（TEG）で測定されるように、ARC19499が、血友病Aおよび血友病B患者由来の全血および血漿試料中の凝固を改善することができることを実証する。

【 0 4 0 8】

血液を、3.2%のクエン酸ナトリウムおよび250μLの1.3mg/mLトウモロコシトリプシン阻害剤（CTI）を含有する3.2mLのVacuetteチューブ内に収集し、最終CTI濃度は100μg/mLであった。試料を、重度（1%未満のFVII、n=10）、中程度（1～5%のFVII、n=7）、および軽度（5～40%のFVII、n=5）血友病Aを有する患者、重度の血友病B（1%未満のFIX、n=5）を有する患者、ならびに健常な志願者（n=10）から収集した。CATアッセイ用の乏血小板血漿（PPP）を調製するために、チューブを2500×gで15分間遠心分離し、上清を新鮮なEppendorfチューブに移し、その後、再び11000×gで5分間遠心分離した。血漿をすぐに使用するか、あるいは後に使用するために-80℃で凍結させるかのいずれかを行った。トロンビン生成へのARC19499の影響を分析するために、ARC19499を、10、100、300、1000、3000、または1

40

50

0, 000 ng/mL (0.9, 9.0, 27.1, 90.3, 271, または 903 nM) の濃度で血漿に添加した。

【0409】

トロンボエラストグラフィー (TEG) アッセイを、Haemoscope の TEG 5000 シリーズの機器を用いて実行した。使い捨ての反応カップ中に、300 μ L の全血を 40 μ L の 9 pM 組織因子 (TF) および 20 μ L の 0.2 M CaCl_2 に添加して、全血 TEG アッセイを実行した。時間トレースに対する振幅を分析して、R 時間 (血栓形成を開始するまでの時間、振幅 = 2 mm)、K 値 (振幅 20 mm に達するのに必要とされる時間に等しい、血栓形成の速度の測定)、および角度 (R 時間に設定されるその開始点で描かれた振幅トレースの接線から計算される、血栓形成の速度の別の測定) を得た。血漿 TEG アッセイを補充的リン脂質 (PL) を含めたことを除いて同様に実行した。これらのアッセイにおいて、300 μ L の PPP を、10 μ L の 38 pM TF、30 μ L の 48 μ M PL (20% ホスファチジルセリン、20% ホスファチジルエタノールアミン、60% ホスファチジルコリン、Avanti Polar Lipids)、および 20 μ L の 0.2 M CaCl_2 と混合した。これらの反応における最終 PL 濃度は 4 μ M であった。

【0410】

図 100 ~ 103 は、健常な志願者 (HV)、重度の血友病 A を有する患者 (SHA)、中程度の血友病 A を有する患者 (MoHA)、および軽度の血友病 A を有する患者 (MiHA) からの代表的な全血 TEG データを示す。健常な志願者、全ての 3 つの血友病 A 患者群、および重度の血友病 B 患者群の平均データが図 104 に示される。ベースライン R 時間の値は、健常な対照と比較して、全ての血友病患者群において上昇し、このことは、血餅開始の遅延を示唆し、最も有意な影響が重度の血友病 A および血友病 B 試料において観察された。さらに、健常な対照と比較して、血友病患者試料の K 値は増加し、角度は減少した。これらの影響は、因子欠乏の重大度にかかわらず、全ての患者群において同様であったが、これらの影響の両方ともに、正常群と比較して、より緩徐な血栓形成を示す。

【0411】

個別のデータ (図 101 ~ 103) および平均データプロット (図 104) に示されるように、ARC 19499 の添加は、TEG で測定されるように、全血中の血栓形成を改善した。増加した濃度の ARC 19499 (最大 10, 000 ng/mL、903 nM) は、患者群の全てにおいて、TEG パラメータの全てを実質的に正常化した (図 104)。ARC 19499 は、正常な血餅開始 (R 時間) および発達 (K 値および角度) を回復させた。

【0412】

同様の結果が、血漿 TEG アッセイで観察された。重度の血友病 A (SHA)、中程度の血友病 A (MoHA)、軽度の血友病 A (MiHA) を有する代表的な患者からの個別の血漿 TEG データが図 105 ~ 107 に示され、平均データは図 108 に示される。血友病血漿試料におけるベースライン凝固効果は、3 つ全ての TEG パラメータにおいて疾患重症度との相関への傾向を示し、最も実質的な効果が重度の血友病 A および血友病 B 試料で観察された (図 108)。ARC 19499 の添加は、血栓形成を示す 3 つ全てのパラメータを改善した。増加した濃度の ARC 19499 は、R 時間および K 値で測定されるように、患者群の全てにおいて凝固を正常化するように見えた。対照的に、ARC 19499 が、軽度および中程度の血友病 A 群の両方の角度を正常化するように見えた一方で、重度の血友病 A および血友病 B 群の角度は、試験した最高濃度の ARC 19499 においてさえも完全には補正されなかった。それにもかかわらず、実質的な改善が、群の全てにおいて観察された。

【0413】

以下の表：表 8. 重度の血友病 A (SHA)、表 9. 中程度の血友病 A (MoHA)、表 10. 軽度の血友病 A (MiHA)、表 11. 重度の血友病 B (SHB)、および表 12. 正常群における全血 TEG 測定についての平均データが、四分位範囲で示される。さら

なる表は、血漿 TEG 測定：表 13. 重度の血友病 A (SHA)、表 14. 中程度の血友病 A (MoHA)、表 15. 軽度の血友病 A (MiHA)、表 16. 重度の血友病 B (SHB)、および表 17. 正常群についての平均データを四分位範囲で示す。表の全てにおいて、各パラメータの予期された正常な範囲は、欄見出しの斜字体で示される。総合すると、本データは、ARC 19499 が、全ての重症度レベルの血友病 A 患者血漿および重度の血友病 B 血漿中の血栓形成を改善することを示す。

【表 8】

表 8：CTI を有するクエン酸血液における TGT-SHA (n = 10)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] <i>10.6~15.6</i>		K [分] <i>1.2~14.8</i>		角度 [度] <i>32.1~56.7</i>	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	11.1	10.2~18.3	4	3.3~6.6	49.6	33.3~54.2
3000	15.2	11.2~20.4	5.3	3.6~7.5	38.7	31.2~50.8
1000	16.4	13.5~21.8	6.8	4.4~9.0	35.7	25.6~47.5
300	19.7	16.4~29.0	8.2	5.4~10.4	30.7	23.6~36.3
100	25.3	19.6~33.0	9	6.3~12.6	25.8	17.1~33.1
10	31.9	25.9~50.9	14.7	11.3~25.3	19.5	11.0~20.1
0	53	43.8~73.0	23	15.8~29.9	8.2	5.0~13.15

10

20

【表 9】

表 9：CTI を有するクエン酸血液における TGT-MoHA (n = 7)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] <i>5.9~16.3</i>		K [分] <i>1.7~5.3</i>		角度 [度] <i>48.5~59</i>	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	9	4.5~12.4	3.8	3.2~4.8	54.1	51~59
3000	10.7	7.7~16.1	4.7	3.6~6.1	45.3	43.6~52
1000	11.6	6.75~17	6	3.9~10.4	43	29.7~50.3
300	14.1	6.0~16.2	6.7	3.8~10.8	42.5	30.4~48.7
100	14.3	10.2~17.8	7	6.0~9.2	35.9	29.1~40.1
10	18	11.2~21.5	7.4	4.0~10.1	27.7	26.6~37.8
0	28.1	21.7~37.5	17.6	6.8~20.8	17.1	9.3~23.6

30

40

【表 1 0】

表 1 0 : C T I を有するクエン酸血液における T G T - M i H A (n = 5)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] 5.9~16.3		K [分] 1.7~5.3		角度 [度] 48.5~59	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	7.3	5.5~13.8	4.7	2.7~6.8	48.7	38.4~62.8
3000	7.8	6.5~17.2	8.3	6.4~12.4	42.8	30.0~47.6
1000	8.6	7.9~14.5	11.8	8.0~12.6	41.5	22.0~48.9
300	8.9	7.8~23.1	12.1	9.7~18.5	39.1	21.4~41.0
100	13.3	10.5~24.9	16.6	9.3~22.4	26.8	13.0~41.2
10	16.8	11.8~38.7	19	10.0~32.0	16.5	11.8~30.0
0	22	15.9~46.1	19	10.8~23.8	9.7	5.5~28.0

10

【表 1 1】

表 1 1 : C T I を有するクエン酸血液における T G T - S H B (n = 5)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] 5.9~16.3		K [分] 1.7~5.3		角度 [度] 48.5~67.9	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	13.5	10.3~16.9	4.9	4.2~6.4	40.3	36~46.6
3000	15.2	12.2~18.6	5.5	5~6.4	41.9	36.3~42.6
1000	20.3	17.6~21.2	6.3	5.4~10.2	30.7	21.6~39.6
300	24.6	22.3~31.8	10.3	8~15.5	24.7	17.9~28.9
100	30.4	24.9~34.9	12.5	9.5~14	17	14.1~24.9
10	35.8	30.3~39.2	13.7	11.8~16.3	13.7	11.8~16.3
0	41.6	39.9~57.8	16	14.4~31.8	10.04	6.2~12.5

20

30

【表 1 2】

表 1 2 : C T I を有するクエン酸血液における T G T - H V (n = 1 0)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] 5.9~16.3		K [分] 1.7~5.3		角度 [度] 48.5~67.9	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	9.3	8.7~10.3	2.7	2.1~3.5	58.2	51.7~61.6
3000	8.5	8.3~11.2	3.2	2.3~4.0	58.9	56.7~60.9
1000	8.8	8.4~10.5	2.8	2.2~3.2	57.8	54.8~63.6
300	9.3	8.4~11.2	2.9	2.6~3.4	57.8	54.2~61.2
100	9.9	7.2~12.2	2.8	2.3~4.5	58.5	50.0~62.6
10	10.4	9.4~11.5	2.8	2.3~3.1	57.1	52.0~62.6
0	12	8.6~12.9	3.2	2.8~4.2	56	51.6~57.9

10

【表 1 3】

表 1 3 : C T I を有するクエン酸 P P P における T E G - S H A (n = 1 0)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] 10.6~15.6		K [分] 1.2~14.8		角度 [度] 32.1~56.7	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	10.3	8.9~21.5	10	7.5~14.7	32.3	24.1~38.5
3000	14.2	10.4~23.8	15.4	10.9~17.3	22.3	16.5~25.7
1000	15	15.7~25.7	15.1	12.1~19.0	21.2	18.8~23.9
300	15.7	9.8~29.5	19	7.8~21.0	14.9	11.6~16.8
100	15.8	14.3~34.1	19.6	18.3~21.0	14	10.7~14.4
10	23.6	15.7~29.8	20	19.8~23.0	9.9	8.8~10.7
0	32.6	25.5~55.4	24.1	20.4~27.3	6.1	4.4~7.9

20

30

【表 1 4】

表 1 4 : C T I を有するクエン酸 P P P における T E G - M o H A (n = 7)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] <i>10.6~15.6</i>		K [分] <i>1.2~14.8</i>		角度 [度] <i>32.1~56.7</i>	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	13.8	11.5~15.2	7.3	4.9~9.9	40.4	35.8~45.6
3000	16.8	10.6~21	8.5	5.9~8.9	35.6	30.9~40.2
1000	17.9	12~22.1	8.7	5.1~10.1	32	27.1~36.2
300	18.5	12.6~22.5	10.4	7.4~12.3	23	17.3~29.1
100	19.1	11.9~23.5	11.5	9.3~14.4	20.7	19.2~24.6
10	20.9	13.8~25.6	11.9	9.6~14.4	15.2	13.1~18.7
0	23.6	18.2~28.1	16.5	13~18	12	7.9~14

10

【表 1 5】

表 1 5 : C T I を有するクエン酸 P P P における T E G - M i H A (n = 5)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] <i>10.6~15.6</i>		K [分] <i>1.2~14.8</i>		角度 [度] <i>32.1~56.7</i>	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	11.8	3.4~11.9	3.3	1.3~3.8	56.6	53.3~73.9
3000	11.8	5.2~13.9	3.4	2.0~4.0	52.6	51.3~66.4
1000	12.8	4.0~14.9	3.4	2.3~4.9	50.6	47.8~62.0
300	14	3.7~18.6	3.7	3.5~3.8	46.4	44.1~52.6
100	14.7	5.6~21.7	5	3.8~6.2	37.9	34.5~41.1
10	15.8	13.9~22.0	7.4	4.2~10.1	29.1	23.5~35.1
0	19.8	17.7~26.9	9.6	4.6~12.2	21.1	16.2~35.0

20

30

【表 16】

表 16：CTI を有するクエン酸PPPにおけるTEG-SHB (n=5)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] 10.6~15.6		K [分] 1.2~14.8		角度 [度] 32.1~56.7	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	10.2	8.2~14.3	7.7	4.8~17.7	31.2	20.6~49.9
3000	12.3	9.7~16.9	14.5	6.5~23.2	26.6	17.2~24.1
1000	19.2	12.7~21.8	23	8.5~26.5	22.4	12.1~30.4
300	21	12.5~28.5	24.2	14.3~28.8	12.5	5.2~20.4
100	22.6	13.6~31.6	19.6	16.8~27.4	5.3	4.9~15.3
10	33.1	16.9~38.3	19.1	17.1~28.4	4.8	3.7~14.1
0	36.7	27.9~44.5	22.5	20.5~59.9	2.6	1.5~7.6

10

【表 17】

表 17：CTI を有するクエン酸PPPにおけるTEG-HV (n=10)

ARC 19499(n g/ml)	R 時間 [分] 10.6~15.6		K [分] 1.2~14.8		角度 [度] 32.1~56.7	
	平均	IQR	平均	IQR	平均	IQR
10000	9.8	6.7~13.2	4.8	3.5~6.4	51.2	50.0~53.2
3000	8.7	7.0~10.7	7.8	5.2~10.8	45	44.0~49.9
1000	11.6	11.0~12.1	10.3	5.8~10.5	40.9	39.9~42.0
300	12.7	12.1~13.8	10.4	6.5~11.3	37.7	36.5~40.3
100	14.3	13.1~15.3	10.1	5.9~11.2	39.3	39.6~49.0
10	15	13.1~15.7	11.7	10.1~11.9	38.8	38.2~44.7
0	12.7	12.1~14.3	7.9	4.9~11.3	40.3	38.5~48.3

30

【0414】

実施例 29

本実施例は、ARC 19499 のインビトロ活性を逆転させることができることを実証する。

40

【0415】

4つの拮抗薬（ARC 23085、ARC 23087、ARC 23088、およびARC 23089）をARC 19499と混合し、血友病A血漿において、自動校正トロンビン生成（CAT）およびトロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））アッセイの両方で試験した（図109）。

【0416】

CATアッセイに関して、ARC 19499を、それぞれの拮抗薬と個別に37℃で5分間インキュベートした。次に、混合物を、100 nM ARC 19499の最終濃度および増加した濃度のARC 23085、ARC 23087、ARC 23088、またはARC 23089（2.5、5、10、20、40、80、160、および320 nM）で血

50

友病A血漿に添加した。次に、CATアッセイを、先に説明したように、最終TF濃度1.0 pMを用いて実行した。ARC19499単独で、血友病A血漿のETPを約600 nMから約900 nMに改善した(図109A)。試験した4つ全ての拮抗薬は、80 nMを超える濃度で試験した時に、この改善を阻止した。ARC23085およびARC23089が160 nMでARC19499活性をほぼ完全に逆転させた一方で、ARC23087およびARC23088は、320 nMでARC19499活性をほぼ完全に逆転させた。ピークトロンビンを見ると(図109B)、それら4つの拮抗薬は、80 nMで同様のARC19499活性の部分的逆転を示した。この場合もやはり、160 nMの時点でARC23085およびARC23089がARC19499活性を完全に逆転させた一方で、他の2つの拮抗薬は、320 nMの時点でARC19499活性を完全に逆

10

【0417】

TEG(登録商標)アッセイに関して、ARC19499およびそれら4つの拮抗薬のうちの1つずつを、血友病A血漿と混合し、TFおよびCaCl₂を添加して凝固を開始させた。これを、ARC19499および追加の拮抗薬の37℃での5分間の事前インキュベーションを伴って、およびインキュベーションを伴わずに実行した。ARC19499を単独で試験した時に、アプタマーは、血友病A血漿の延長されたR値を54分から8.3分に補正した(図109C)。ARC23085は、この改善を部分的に逆転させ、それぞれ、5分間の事前インキュベーションを伴って30分、および伴わずに24分のR値となった。ARC23087は、事前インキュベーションなしではARC19499を逆

20

【0418】

これらの実験は、ARC19499のインビトロ活性を逆転させることができることを示唆する。

30

【0419】

実施例30

本実施例は、ARC19499が低分子量ヘパリン(LMWH)のインビトロ抗凝固活性を阻害しないことを実証する。

【0420】

本アッセイにおいて、増加した濃度のARC19499および増加した濃度のLMWHとともに混合し、血友病A血漿に添加した。これらの血漿混合物のロンビン生成能を、自動校正ロンビン生成(CAT)アッセイを用いて分析した。図110は、それぞれのLMWH濃度の存在下での増加したアプタマーの濃度のロンビン生成曲線を示す。ARC19499を、0.1、1、10、100、および1000 nMで試験した。LMWHを、0(図110A)、0.156(図110B)、0.312(図110C)、0.625(図110D)、1.25(図110E)、2.5(図110F)、および5.0 IU(国際単位)/mL(図110G)で試験した。

40

【0421】

図111Aにおいて、それぞれの組み合わせのETP値をy軸に示し、LMWH濃度をx軸に示す。図111Bのピークトロンビン値においても同様に示した。両方の事例において、治療用量のLMWH(0.5~1.0 IU/mL)は、ロンビン生成を強力に阻害し、より高い濃度では、最大1000 nM ARC19499の存在下でさえ、いかなるロンビンの生成もほぼ完全に阻止した(図111)。LMWHの381±24.3 nMお

50

よび $299 \pm 18.0 \text{ nM}$ の IC_{50} 値を、それぞれ、ARC19499 の不在下における ETP および ピクトロンビン データ から計算し、これらの結果は、以前の測定と一致している (Robert et al., Is thrombin generation the new rapid, reliable and relevant pharmacological tool for the development of anticoagulant drugs?, Pharmacol Res. 2009; 59: 160-166)。増加した濃度の ARC19499 は、LMWH の IC_{50} を著しく変化させるようには見えず (図 112)、このことは、ARC19499 が LMWH の抗凝固活性を妨害しないことを示唆する。

【0422】

本実験は、 1000 nM ARC19499 の存在下でさえも、治療量の LMWH が依然としてインビトロアッセイにおいて抗凝固剤のままであることを示唆する。

【0423】

実施例 31

本実施例は、TFPI アプタマーが血清ヌクレアーゼに対して安定であることを実証する。

【0424】

本実験において、各アプタマーの $50 \mu\text{M}$ を、90% のプールされたヒト、カニクイザル、またはラット血清中で、 37°C で 72 時間インキュベートした。図 113 に示されるように、試料を HPLC で分析し、インキュベーション時間の関数として残存する割合を決定した。

【0425】

ARC19498 および ARC19499 の両方ともに、72 時間にわたって、ヒト、サル、ならびにラット血清において 95% を超えて安定していた (図 113 A および 113 B)。

【0426】

ARC19500 は、72 時間にわたって、ヒト、サル、およびラット血清において 92% を超えて安定しており (図 113 C)、ARC19501 は、72 時間にわたって、ヒト、サル、およびラット血清において 80% を超えて安定していた (図 113 D)。

【0427】

ARC19881 は、72 時間にわたって、ヒト、サル、およびラット血清において 78% を超えて安定しており (図 113 E)、ARC19882 は、72 時間にわたって、ヒト、サル、およびラット血清において 91% を超えて安定していた (図 113 F)。

【0428】

実施例 32

本実施例は、TFPI アプタマーが生物学的活性を有することを実証する。

【0429】

本実験において、血友病 A の非ヒト霊長類モデルを、カニクイザルに、ヒト第 VII 因子 (20 mg 、50,000 ベセズダ単位) に対するヒッジ多クローン性抗体の単回静脈内 (IV) ボーラスを注入することにより作成した。静脈内注入の 3.5 時間後、サルを、生理食塩水 (1 mL/kg)、組換え第 VIIa 因子 (rFVIIa) (NovoSeven (登録商標)、 $90 \mu\text{g/kg}$ ボーラス)、または ARC19499 ($600 \mu\text{g/kg}$ 、 $300 \mu\text{g/kg}$ 、もしくは $100 \mu\text{g/kg}$ ボーラスのいずれか) のいずれかで処理した。クエン酸血液試料を、抗体投与前 (ベースライン)、抗体投与の 2.5 時間後、薬物/生理食塩水での処理の 15 分間後 (時間 = 3.75 時間)、ならびに薬物/生理食塩水での処理の 1 時間および 2 時間後 (それぞれ、時間 = 4.5 および 5.5 時間) に得た。血液を処理して血漿を生成し、クエン酸血漿試料を、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)、第 VII 因子機能、およびトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) についてアッセイした。生理食塩水で処理したサルは、5.5 時間の時点で引き出された後に、ARC19499 ($600 \mu\text{g/}$

10

20

30

40

50

kg) の治療を受けた。本治療を受けてから 15 分後に、別のクエン酸血液試料を注ぎ、血漿を処理した。

【0430】

ARC19499 がサルTFPI を阻害することを確実にするために、抗体処理後にサルから採取された血漿を、1~1000 nM の増加した濃度の ARC19499 とエクスピボで混合し、TEG (登録商標) アッセイで試験した (図 114)。アプタマーを混合した血漿を、抗体処理前および抗体処理後の両方において (それぞれ、実線および点線)、アプタマーを有さない血漿と比較した。抗体処理のみが、R 値を延長した。この抗体で処理された血漿への ARC19499 の添加は、R 値をベースラインレベル近くまで補正し、このことは、アプタマーがサル血漿と交差反応したことを示唆する。

10

【0431】

抗体注入の 2.5 時間後に回収した血漿試料において、第VII因子レベルは 0.6% を下回り、5.5 時間のアッセイにわたってそのままの状態であった (図 115)。予想通り、FVII に対して非感受性である PT は、抗体投与後に変化しないままであったが (図 116A)、rFVIIa の注入時に、PT 値の 13.0 ± 0.4 秒から 10.7 ± 0.4 秒へのわずかな下落があった。aPTT 値は、第VII因子抗体の投与後に増加した (図 116B)。PT アッセイで見られるように、rFVIIa 投与は、aPTT アッセイにおける凝固時間の減少をもたらした。生理食塩水処理時に、aPTT 値に変化はなかった。(全ての濃度での) ARC19499 での治療は、aPTT の延長をもたらした。5.5 時間後の時点で ARC19499 ボーラス投与を受けた生理食塩水で処理した動物も、アプタマー投与後に aPTT の延長を示した。この血友病 A 様のモデルにおける血栓の発達への ARC19499 での治療の影響を、組織因子 (TF) 活性化 TEG (登録商標) を用いてアッセイした。試験した全ての動物において、抗体投与は、R 値の延長をもたらした (図 117A)。生理食塩水での処理が R 値にさらなる影響を与えなかった一方で、rFVIIa ならびに $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ および $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 での治療の両方ともに、ベースラインに近いレベルまでの R 値の減少をもたらした。ARC19499 の $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 用量は無効用量であり、R 値にプラスの影響を与えなかった。生理食塩水で処理したサルにおいて、研究の終盤での ARC19499 のさらなる注入は、R 値の減少に即効性があった。角度 (図 117B) および最大振幅 (MA) (図 117C) は、抗体投与後に両方ともに減少した。 $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ および $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 での治療は、NovoSeven (登録商標) と同様に、角度にますます影響を与えるように見えた一方で、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 での治療は、生理食塩水処理と同様に反応を示した (図 117B)。生理食塩水を含む処理の全ては、MA に付加的影響を与えないように見えた (図 117C)。

20

30

【0432】

第2の一連の関連実験において、サルを、同一濃度の抗FVII抗体で、続いて、1時間後に、 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ARC19499 または $90 \mu\text{g}/\text{kg}$ NovoSeven (登録商標) で処理した。クエン酸血液試料を得て、抗体投与の60分間後、ならびに薬物投与の60、120、180、240、300、および420分後に、ベースラインの血漿を処理した。血漿試料を、上述のように、TF活性化TEG (登録商標) アッセイを用いて試験した。前述同様に、抗体投与は、R 値の増加 (図 118A)、ならびに角度およびMA値の減少 (図 118B~C) をもたらした。ARC19499 および NovoSeven (登録商標) は、非常に類似した様式で反応を示し、R 値をベースラインレベル近くまで回復させ、角度およびMA値の両方を改善した (図 118)。

40

【0433】

総合すると、第VII因子、aPTT、およびTEG (登録商標) の全てが、これらのサルにおいて、血友病 A 様の状態をうまく引き起こしたことを示唆する。ARC19499 の注入時の aPTT の適度な延長は、恐らく、先に他のアプタマーで観察された、内因性カスケードのさらなる非特異的阻害を反映する。しかしながら、TEG (登録商標) アッセイで測定される TF 活性化血漿における凝固時間 (R 値) の明確な補正は、第VII

50

I 因子の欠損による止血欠陥が、TFPI の ARC19499 阻害によりうまく回避されたことを示唆する。

【0434】

ARC19499 での治療におけるさらなる観察で、TFPI の血漿レベルの増加をもたらすように見えた。予備実験において、ARC19499 での治療後、上述のこれらのカニクイザル実験からの試料の TFPI 濃度は、1 : 40 で希釈した際に TFPI ELISA の定量の上限を超えた。静脈内または皮下 (SC) 投与のいずれかを介して非常に高い用量 (20 mg/kg) の ARC19499 を受けたカニクイザル由来の EDTA 血漿試料の TFPI レベルを測定することにより、この結果をより綿密に分析した。血液試料を 2 週間にわたって定期的に注ぐことにより、より延長された ARC19499 への曝露後の TFPI 血漿濃度における変化の評価を可能にした。TFPI 濃度を、以下：投与前、投与後 0.083 (静脈内のみ)、0.5、2、6、12、36、72、120、168、240、および 336 時間の時点で連続して希釈した血漿試料 (最大 1 : 1600 に希釈) 中で測定した。ARC19499 の静脈内投与または皮下投与のいずれかで治療された動物において、TFPI レベルは、第 1 の時点で約 0.2 nM (投与前) から 5 ~ 7 nM にすぐに増加し、その後、ピークレベルまでの時間にわたってより緩徐に、それぞれ、 91 ± 12 および 71 ± 2 nM に増加した (図 119)。TFPI レベルのパターンは、静脈内投与または皮下投与のいずれかで治療されたサルにおいて類似しており、72 ~ 120 時間の時点でピークレベルまで増加し、緩徐な下落が続いた。しかしながら、ARC19499 t_{max} 推定値は、それぞれ、静脈内投与では 5 分、皮下投与では 24 時間であった (データ示されず)。したがって、ARC19499 がインビボで血漿 TFPI の増加を促したが、長期にわたる TFPI および ARC19499 濃度の変化は、必ずしも相関しているわけではない。TFPI の増加の機構は知られていないが、ARC19499 への最初の曝露が内皮細胞表面からの TFPI の急速な放出を引き起こした一方で、それに続く増加は、細胞内貯蔵からの TFPI の緩徐な放出、TFPI 発現の上方調節、および/または TFPI クリアランス機構の阻害によるものである可能性がある。アプタマー治療の際のこの血漿 TFPI レベルの増加は、ARC19499 に対して特異的であった。TFPI 以外の標的に対するアプタマーは、TFPI レベルを増加させるようには見えず、特に、ARC19499 と同一のレベルまで増加させるようには見えなかった (データ示されず)。

【0435】

実施例 33

本実施例は、ARC19499 が血友病 A の非ヒト霊長類 (NHP) モデルの出血時間を短縮し、この短縮された出血時間が、大抵の場合において、血友病 A に関連し、かつ以下で説明される NHP モデルに含まれる延長された R 値からのトロンボエラストグラフィー (TEG (登録商標)) R 値 (初期血栓形成までの時間の測定) の同時補正により反映されることを実証する。

【0436】

ARC19499 で治療した場合の出血時間および ARC19499 で治療しなかった場合の出血時間を、カニクイザルに抗 FVII 抗体 (FVII Ab) を投与して血友病 A 様の状態を引き起こした血友病 A の NHP モデルにおいて評価した。図 120 に図示されるように、出血時間を、実験の開始時 (ベースライン)、次いで、FVII Ab 投与の 2.5 時間後に測定した。次に、1 mg/kg ARC19499 のボラス投与での処理を開始した。出血時間を、全てのサル群について、第 1 の ARC19499 投与の 1 時間後に測定した。出血時間が補正されなかったサルに関して、出血時間を、第 2 の ARC19499 投与の 17 分後に再評価した。出血時間が依然として補正されなかったサルに関して、出血時間を、第 3 の ARC19499 投与の 17 分間後に再評価した (第 3 群および第 4 群)。

【0437】

血液試料の出血時間の評価および収集に関して、サルを麻酔し、血圧決定のために大腿静

脈内に線を設置し、出血時間の評価に使用した伏在静脈の反対側の伏在静脈に、投薬およびサンプリングのために、22ゲージのカテーテルを挿入した。出血時間の評価および関連したFV I I I AbとARC19499投薬のスケジュールならびに血液サンプリングが図120に示される。前処理ベースライン血液試料および出血時間（前処理出血時間、 BT_0 ）を、それぞれ、FV I I I Ab投薬の10分前および5分前に採取した。まず生理食塩水を混合した約3～4mLの血液を回収することにより血液試料を採取し、その後、それを取っておいた。次に、希釈されていない血液試料を、シリンジを用いて採取した。収集した血液をすぐにクエン酸塩含有チューブ内に注入し、10回反転させて混合した。クエン酸全血の試料をTEG（登録商標）で分析し、残りのクエン酸血液を処理して分析用の血漿を得た。次に、第1の血液－生理食塩水試料を、サルに戻し注入し、その後、採取した血液試料と同等の量の生理食塩水を流した。

10

【0438】

伏在静脈を出血時間の評価のために曝露した。22ゲージ、1インチの皮下注射針（Kendall Monoject, Kendall Healthcare, Mansfield, MA）を、止血鉗子を用いて90°の角度に対して斜角で慎重に屈曲させ、屈曲は、注射針の先端から5mmであった。注射針を、注射針の屈曲に至るまで曝露した静脈内に挿入し、1つの静脈壁のみに穿刺した。血液を、Surgicutt Bleeding Time Blotting Paper（ITC, Edison, NJ）を用いて静脈から取り出し、実際の穿刺部位に触れないように注意した。血液を取り出す能力の喪失によって決定されるように、出血開始の瞬間から出血停止までの時間を測定した。血圧を、出血時間評価の1～5分前および1～5分後に測定した。出血時間の評価後、創傷をGluture（Abbott Labs, Abbott Park, IL）で閉じた。

20

【0439】

FV I I I Ab（Haematologic Technologies Inc（Essex Junction, VT）のヒツジ抗ヒトFV I I I多クローン性抗体、ロットY1217）を、出血時間の評価に使用した伏在静脈の反対側の伏在静脈に設置した22ゲージのカテーテルを介する緩徐な単回ボラス投与として、サルの静脈内に投与（静脈内投与）した。これを使用するまで－80℃で凍結保存し、使用前に3回を超えずに解凍および再凍結させた。それぞれのサルは、12, 642ベセズダ単位/kgのFV I I I Abを受けた。FV I I I Abを与えた2時間後に別の血液試料を採取し、30分間後に出血時間を評価した（FV I I I投与後の出血時間、 $BT_{FV I I I}$ ）。ARC19499の第1の用量を、緩徐な単回ボラス投与として静脈内投与した。第V I I I因子AbまたはARC19499のいずれかの投与前の全ての事例において、0.5～1.0mLの流体をカテーテルから除去し、FV I I I AbまたはARC19499を投与し、その後、カテーテルを2～3mLの温生理食塩水で洗い流した。血液試料を55分間後に採取した。第1のARC19499用量の投与の1時間後、出血時間を評価した（ARC19499の第1の用量投与後の出血時間、 BT_1 ）。次に、出血時間が第1のARC19499用量によって補正されたかを決定した。処理前のベースラインと第1のARC19499用量投与後の出血時間との間の差異が、処理前のベースラインとFV I I I投与後の出血時間との間の差異の半分未満（すなわち、 $(BT_1 - BT_0) / (BT_{FV I I I} - BT_0)$ が0.5未満）である場合に、補正が実現されたと見なされる。出血時間が無事に補正された場合、その動物についての出血時間の研究を終了した。出血時間が補正されなかった場合、第2の1mg/kg ARC19499用量を、先の出血時間の評価の開始10分後に投与した。血液試料を12分後に採取し、出血時間の評価を第2のARC19499注入の17分後に開始した（第2のARC19499用量投与後の出血時間、 BT_2 ）。次に、出血時間が第2のARC19499用量によって補正されたかを決定した。出血時間が無事補正された場合、その動物についての出血時間の研究を終了した。出血時間が補正されなかった場合、第3の1mg/kg ARC19499用量を、先の出血時間の評価の開始10分後に投与した。血液試料を12分後に採取し、出血時間

30

40

50

の評価を第3のARC19499注入の17分後に開始した（第3のARC19499用量投与後の出血時間、 BT_3 ）。次に、出血時間が第3のARC19499用量によって補正されたかを決定した。出血時間が無事補正されたかにかかわらず、その動物についての出血時間の研究を終了した。出血時間が補正されなかった場合、第4の 3 mg/kg ARC19499用量を、先の出血時間の評価の開始14分後に投与し、血液試料を全血TEG（登録商標）分析のために採取したが、本研究で利用した種類に類似した利用可能な静脈の種類が欠如のため、これ以上出血時間を評価しなかった。翌24時間にわたる出血の予防措置として、それぞれの動物の回復前にARC19499（ $1\sim 3\text{ mg/kg}$ ）をさらに投与した。それぞれの動物の血液サンプリング、化合物の投与、および出血時間の評価の実際の時点は、報告した時点の5分以内である。

10

【0440】

本研究におけるサル由来のクエン酸血漿中のFVIIa活性レベルを、Chromogenic（Diapharma, Columbus OH）のCoamatic FVIIaアッセイを用いて測定した。本研究中に得た試料を、処理前のベースライン血漿試料のプールから生成された標準曲線と比較した。全ての試料および標準物質を、キット添付の反応緩衝液中で80倍に希釈した。反応を製造業者の指示通りに実行し、 405 nm での吸光度の変化を45分間にわたって読み取った。カニクイザル血漿試料に関連するFVIIa活性レベルは、表18および図121（表18Aおよび図121A：第1群：出血時間を1回用量の 1 mg/kg ARC19499で補正したサル、表18Bおよび図121B：第2群：出血時間を2回用量の 1 mg/kg ARC19499で補正したサル、表18Cおよび図121C：第3群：出血時間を3回用量の 1 mg/kg ARC19499で補正したサル、表18Dおよび図121D：第4群：出血時間を3回用量の 1 mg/kg ARC19499補正しなかったサル）に示される。抗体処理の前に、全てのサル由来の血漿は、 $57.6\%\sim 93.5\%$ まで様々な非常に高いFVIIa活性レベルを有した（表18）。抗体処理後、この活性は、全ての動物において測定可能なレベル未満（ 0.1% 未満）に減少し、本アッセイにわたって低いままであった（図121）。最も重要なことに、本アッセイは、動物の異なる群の間のFVIIa不活性化のレベルに差異を留意せず、このことは、出血時間を補正するのに必要とされるARC19499の用量が、FVIIa投与後のFVIIa活性の異なるレベルには関連していないことを示唆する。

20

30

【表18-A】

表18. FVIIa活性レベル

A.第1群:出血時間が1回用量の 1 mg/kg ARC19499により補正されたサル							
	時点	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(分)	%	%	%	%	%	%
ベースライン	-10	64.4	57.6	74.1	93.5	71.8	82.4
FVIII ab 処理の2 時間後	120	-1.6	-2.2	-1.8	-1.5	-1.8	-2.6
第1の ARC1949 9処理の 55分後	210	-1.5	-2.1	-1.8	-2.2	-1.6	-2.3

40

50

【表 1 8 - B】

B.第2群:出血時間が2回用量の 1mg/kg ARC19499 により補正されたサル					
	時点	NHP 0610301	NHP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011
	(分)	%	%	%	%
ベースライン	-10	63.0	79.6	59.5	89.7
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	-2.1	-0.3	-2.3	-2.0
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	-2.2	-0.1	-2.2	-1.9
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	237	特定されず	0.1	-2.2	-1.7

10

【表 1 8 - C】

C.第3群:出血時間が3回用量の 1mg/kg ARC19499 により補正されたサル		
	時点	NHP0702073
	(分)	%
ベースライン	-10	76.8
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	0.0
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	-0.2
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	239	-0.3
第 3 の ARC19499 処理の 12 分後	278	0.3

20

30

【表 1 8 - D】

D.第4群:出血時間が3回用量の 1mg/kg ARC19499 により補正されなかったサル		
	時点	NHP0607367
	(分)	%
ベースライン	-10	62.5
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	0.8
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	-1.4
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	237	-2.0
第 3 の ARC19499 処理の 12 分後	264	-2.0
第 4 の ARC19499 処理の 12 分後	296	-1.7

40

【 0 4 4 1】

(出血時間が 1 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正された) 第 1 群のサ

50

ルの群平均出血時間（±標準誤差）が表 19 に示される。血液試料の時点に対するこの群の群平均出血時間も図 122 に図示する（図 122 A：秒単位、図 122 B：ベースライン出血時間の %）。抗 F V I I I 抗体での処理は、群平均出血時間を群平均ベースライン出血時間の $203 \pm 15\%$ に延長するという結果をもたらした。 1 mg/kg ARC19499 でのサルの処理は、群平均出血時間を本質的にベースラインレベルまで戻して補正した（群平均ベースライン出血時間の $102 \pm 11\%$ ）。第 1 群のサルの個別の出血時間が表 20 に示され、それぞれの時点での個別のサルの出血時間も図 123 でプロットする。（図 123 A：秒単位、図 123 B：ベースライン出血時間の %）。この群の全てのサルは、F V I I I Ab の投与に反応して、それらのベースライン出血時間と比較して、出血時間の延長を示した（範囲：ベースライン出血時間の $162 \sim 252\%$ ）。この群の全てのサルは、 1 mg/kg ARC19499 の投与に反応して、それらのベースライン出血時間と比較して、出血時間の補正も示した（範囲：ベースライン出血時間の $82 \sim 152\%$ ）。

【表 19】

表 19. 出血時間が 1 回用量の 1 mg/kg ARC19499 により補正されたサルの平均出血時間（第 1 群）

第 1 群:平均出血時間			
	時点	平均	標準誤差
	(分)	(秒)	(秒)
ベースライン	-5	41	5.1
FVIII ab 処理の 2.5 時間後	150	84	13
ARC19499 処理の 1 時間後	215	40	3.5

【表 20】

表 20. 出血時間が 1 回用量の 1 mg/kg ARC19499 により補正されたサルの個別の出血時間（第 1 群）

第 1 群:個別の出血時間							
	時点	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(分)	(秒)	(秒)	(秒)	(秒)	(秒)	(秒)
ベースライン	-5	36	23	45	42	41	61
FVIII ab 処理の 2.5 時間後	150	62	58	85	68	85	145
ARC19499 処理の 1 時間後	215	31	35	37	47	38	54

【0442】

（出血時間が 2 回用量の 1 mg/kg ARC19499 により補正された）第 2 群のサルの群平均出血時間（±標準誤差）が表 21 に示される。血液試料の時点に対するこの群の群平均出血時間も図 124 に図示する（図 124 A：秒単位、図 124 B：ベースライ

ン出血時間の%)。抗FV I I I抗体での処理は、群平均出血時間を群平均ベースライン出血時間の $195 \pm 26\%$ に延長するという結果をもたらした。 1 mg/kg ARC19499でのサルの処理後、群平均出血時間が減少したが、群平均ベースライン出血時間の $175 \pm 20\%$ のみであった。その後、追加用量の 1 mg/kg ARC19499が、本質的にベースラインレベルまで群平均出血時間を減少させた(群平均ベースライン出血時間の $94 \pm 17\%$)。第2群のサルの個別の出血時間が表22に示され、それぞれの時点での個別のサルの出血時間も図125でプロットする(図125A:秒単位、図125B:ベースライン出血時間の%)。この群の全てのサルは、FV I I I abの投与に反応して、処理前のそれらのベースライン出血時間と比較して、出血時間の延長を示した(範囲:ベースライン出血時間の $143 \sim 263\%$)。 1 mg/kg ARC19499の投与後、それらのサルの3匹が出血時間のわずかな減少を示した一方で、1匹のサルは、出血時間の微増を示した。この群の全てのサルは、 1 mg/kg ARC19499の第2の用量に反応して、出血時間の補正を示した(範囲:ベースライン出血時間の $61 \sim 138\%$)。

【表21】

表21. 出血時間が2回用量の 1 mg/kg ARC19499により補正されたサルの平均出血時間(第2群)

第2群:平均出血時間			
	時点	平均	標準誤差
	(分)	(秒)	(秒)
ベースライン	-5	35	12
FVIII ab 処理の2.5時間後	150	62	13
第1のARC19499処理の1時間後	215	59	16
第2のARC19499処理の17分後	242	31	8.4

【表22】

表22. 出血時間が2回用量の 1 mg/kg ARC19499により補正されたサルの個別の出血時間(第2群)

第2群:個別の出血時間					
	時点	NHP 0610301	HP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011
	(分)	(秒)	(秒)	(秒)	(秒)
ベースライン	-5	29	23	70	19
FVIII ab 処理の2.5時間後	150	60	38	100	50
第1のARC19499処理の1時間後	215	50	33	107	44
第2のARC19499処理の17分後	242	40	14	50	20

【0443】

第3群のサルの出血時間が表23に示され、血液試料の時点に対する出血時間も図126

に図示する（図 1 2 6 A：秒単位、図 1 2 6 B：ベースライン出血時間の％）。このサルは、F V I I I A b の投与に反応して、その出血時間をベースライン出血時間の 2 2 0 % に延長させることを示した。A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、出血時間は、ベースラインの 3 3 0 % に増加した。2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのこのサルの処理は、出血時間をベースライン出血時間の 2 1 0 % に減少させるという結果をもたらした。この第 2 の用量が実際に出血時間を補正しなかったことを確認するために、さらなる出血時間の評価を第 2 の用量の A R C 1 9 4 9 9 の投与の 3 8 分後に実行した。この 4 5 秒の出血時間は、第 2 の A R C 1 9 4 9 9 用量を与えた 1 2 分後に測定した 4 2 秒に非常に近く、出血時間が 2 回用量の A R C 1 9 4 9 9 により補正されなかったことを確認した。追加用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 は、出血時間をベースライン出血時間の 8 5 % に補正した。

10

【表 2 3】

表 2 3. 出血時間が 3 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの出血時間（第 3 群）

第 3 群:出血時間		
	時点	NHP0702073
	(分)	(秒)
ベースライン	-5	20
FVIII ab 処理の 2.5 時間後	150	44
第 1 の ARC19499 処理の 1 時間後	215	66
第 2 の ARC19499 処理の 17 分後	243	42
第 2 の ARC19499 処理の 37 分後	263	45
第 3 の ARC19499 処理の 17 分後	282	17

20

【 0 4 4 4 】

第 4 群のサルの出血時間が表 2 4 に示され、血液試料の時点に対する出血時間も図 1 2 7 に図示する（図 1 2 7 A：秒単位、図 1 2 7 B：ベースライン出血時間の％）。このサルは、F V I I I A b の投与に反応して、その出血時間をベースライン出血時間の 1 4 3 % に延長させることを示した。A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、出血時間は、ベースライン出血時間の 1 9 3 % まで著しく増加した。2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのこのサルの処理後の出血時間は、その後、ベースライン出血時間の 1 5 4 % まで減少した。追加用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 は、出血時間を有意に変化することができず、ここではベースライン出血時間の 1 5 9 % であった。先の評価で使用した静脈と一致した十分な利用可能な静脈を欠如するため、この動物においてさらなる出血時間の評価を行うことができなかった。

30

【表 2 4】

表 2 4. 出血時間が 3 回用量の $1 \text{ mg} / \text{kg}$ ARC 1 9 4 9 9 により補正されなかったサル
の出血時間 (第 4 群)

第 4 群:出血時間		
	時点	NHP0607367
	(分)	(秒)
ベースライン	-5	56
FVIII ab 処理の 2.5 時間後	150	80
1 時間後第 1 の ARC19499 処理	215	108
第 2 の ARC19499 処理の 17 分後	243	86
第 3 の ARC19499 処理の 17 分後	273	89

10

【 0 4 4 5】

カニクイザル全血の凝固状態を、クエン酸全血試料上で TEG (登録商標) アッセイを用いて分析した。凝固反応を開始するために、 $330 \mu\text{L}$ のクエン酸全血を、 $20 \mu\text{L}$ 0.2 M [Haemonetics Corporation (Braintree, MA)] および $10 \mu\text{L}$ 組織因子 (TF) を含有する使い捨てカップ (Haemonetics Corp、カタログ番号 6211) に添加した (37°C で最終希釈 $1:200000$)。Innovin (Dade-Behring, Newark, DE) を、組織因子 (TF) 源として使用し、製造業者の推奨通りに水中で再構成し、使用前に 0.9% 生理食塩水中で $1:5555$ に希釈した。再構成した原液 Innovin を、 4°C で 4 週間未満保存した。初期血栓形成に対する時間 (R 値) を、Haemoscope TEG (登録商標) 5000 システム (Haemonetics Corporation, Braintree, MA) を用いて測定した。

20

【 0 4 4 6】

(出血時間が 1 回用量の $1 \text{ mg} / \text{kg}$ ARC 1 9 4 9 9 により補正された) 第 1 群のサルの群平均 R 値 (±標準誤差) が表 2 5 に示される。血液試料の時点に対する群平均 R 値も図示する (図 1 2 8)。FVII ab での処理は、群平均 R 値を群平均ベースライン R 値の約 4.8 倍に延長するという結果をもたらした。 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ ARC 1 9 4 9 9 でのサルの処理が、FVII ab での処理後に得た値から群平均 R 値を減少させた一方で、この R 値は、依然として群平均ベースライン R 値の約 3.2 倍であった。第 1 群のサルの個別の R 値が表 2 6 に示され、血液試料の時点に対する個別の R 値も図 1 2 9 に図示する。この群の全てのサルは、FVII ab の投与に反応して、処理前のそれらのベースライン R 値と比較して、R 値の延長を示した ($2.9 \sim 9.4$ 倍の範囲)。この群の 1 匹を除く全てのサルが、 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ ARC 1 9 4 9 9 の投与に反応して、処理前のそれらのベースライン R 値と比較して、R 値の減少も示した ($1.4 \sim 5.3$ 倍の範囲)。1 匹のサル、NHP 0 7 0 1 5 6 5 は、 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ ARC 1 9 4 9 9 の投与後に R 値の微増を示した。

30

40

【表 2 5】

表 2 5. 出血時間が 1 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの平均全血 T E G (登録商標) R 値 (第 1 群)

第 1 群:平均全血 TEG (登録商標) R 値			
	時点	平均	標準誤差
	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	5.6	0.93
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	27	3.3
ARC19499 処理の 55 分後	210	18	4.8

10

【表 2 6】

表 2 6. 出血時間が 1 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの個別の全血 T E G (登録商標) R 値 (第 1 群)

第 1 群:個別の全血 TEG (登録商標) R 値							
	時点	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	8.5	特定されず	6.0	2.2	5.0	6.2
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	38.6	28.8	34	20.7	22.6	17.8
ARC1949 9 処理の 55 分後	210	29.4	10.9	35.5	11.6	9.8	8.4

20

30

【 0 4 4 7】

(出血時間が 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正された) 第 2 群のサルの群平均 R 値 (±標準誤差) が表 2 7 に示される。血液試料の時点に対する群平均 R 値も図 1 3 0 に図示する。抗 F V I I I 抗体での処理は、群平均 R 値を群平均ベースライン R 値の約 5 . 9 倍に延長するという結果をもたらした。出血時間を補正しなかった A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、群平均 R 値は、群平均ベースライン R 値の約 4 . 0 倍に減少した。この群の出血時間を補正した 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのサルの処理は、F V I I I A b での処理後に得た値から群平均 R 値をさらに減少させたが、この R 値は、依然として群平均ベースライン R 値の約 3 . 5 倍であった。第 2 群のサルの個別の R 値が表 2 8 に示され、血液試料の時点に対する個別の R 値も図 1 3 1 に図示する。この群の全てのサルは、F V I I I A b の投与に反応して、ベースラインでの処理前のそれらのベースライン R 値と比較して、R 値の延長を示した (4 . 0 ~ 9 . 1 倍の範囲)。この群の 1 匹を除く全てのサルは、1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 の投与に反応して、処理前のそれらのベースライン R 値と比較して、R 値の減少も示し (2 . 4 ~ 5 . 0 倍の範囲)、この群の出血時間の全てを補正した 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのこれらのサルの処理は、これらのサルのうちの 2 匹の R 値をさらに減少させ、第 3 のサルの R 値をわずかに増加させた。1 匹のサル、N H P 0 6

40

50

11655は、1mg/kg ARC19499の投与後に、FVIIIAb注入後のR値と比較して、103%のR値の増加を示し、出血時間を補正した追加の1mg/kg ARC19499でのこのサルの処理は、ベースラインR値の6.4倍までR値を減少させた。

【表27】

表27. 出血時間が2回用量の1mg/kg ARC19499により補正されたサルの平均全血TEG（登録商標）R値（第2群）

第2群:平均全血 TEG（登録商標）R 値			
	時点	平均	標準誤差
	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	6.0	1.0
FVIII ab 処理の2時間後	120	36	4.5
第1の ARC19499 処理の55分後	210	24	8.7
第2の ARC19499 処理の12分後	237	21	7.1

10

【表28】

表28. 出血時間が2回用量の1mg/kg ARC19499により補正されたサルの個別の全血TEG（登録商標）R値（第2群）

第2群:個別の全血 TEG（登録商標）R 値					
	時点	NHP 0610301	NHP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011
	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	特定されず	8.1	6.0	4.0
FVIII ab 処理の2時間後	120	46.3	35.8	24.1	36.2
第1の ARC19499 処理の55分後	210	8.2	19.8	48.9	19.9
ARC19499 処理の12分後	237	6.7	11.9	38.3	25.6

30

【0448】

第3群のサルのR値が表29に示され、血液試料の時点に対するR値も図132に図示する。このサルは、FVIIIAbの投与に反応して、そのベースラインR値の7.6倍のそのR値の延長を示した。出血時間を補正しなかったARC19499の1mg/kg用量での処理に反応して、R値は、ベースラインR値の6.1倍に減少した。このサルの出血時間も補正しなかった2回用量の1mg/kg ARC19499でのこのサルの処理は、さらにR値をベースラインのR値の5.8倍にわずかに減少させた。出血時間を補正した追加用量の1mg/kg ARC19499は、R値をベースラインR値の3倍に減少させた。

40

【表 29】

表 29. 出血時間が 3 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの
全血 T E G (登録商標) R 値 (第 3 群)

第 3 群:全血 TEG (登録商標) R 値		
	時点	NHP0702073
	(分)	(分)
ベースライン	-10	3.9
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	29.5
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	23.6
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	239	22.5
第 3 の ARC19499 処理の 12 分後	278	11.8

10

【0449】

第 4 群のサルの R 値が表 30 に示され、血液試料の時点に対する R 値も図 133 に図示する。このサルは、F V I I I A b の投与に反応して、そのベースライン R 値の 2.9 倍の延長を示した。出血時間を補正しなかった A R C 1 9 4 9 9 の 1 mg / k g 用量での処理に反応して、R 値は、ベースライン R 値の 1.6 倍に減少した。このサルの出血時間も補正しなかった 2 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 でのこのサルの処理は、さらに R 値をベースライン R 値の 1.5 倍にわずかに減少させた。依然として出血時間を補正しなかった追加用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 は、R 値をベースライン R 値の 1.2 倍強にわずかに減少させた。第 4 の 3 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 用量は、R 値にほとんど影響を与えず、ここでは処理前のベースライン R 値の 1.1 倍であった。先の評価で使用した静脈と一致した十分な利用可能な静脈を欠如するため、この動物においてさらなる出血時間の評価を行うことができなかった。

20

【表 30】

表 30. 出血時間が 3 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されなかった
サルの全血 T E G (登録商標) R 値 (第 4 群)

30

第 4 群:全血 TEG (登録商標) R 値		
	時点	NHP0607367
	(分)	(分)
ベースライン	-10	7.2
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	21.2
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	11.2
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	237	10.7
第 3 の ARC19499 処理の 12 分後	264	8.8
第 4 の ARC19499 処理の 12 分後	296	8.1

40

【0450】

カニクイザル血漿の凝固状態も、クエン酸血液試料由来の血漿において T E G (登録商標) アッセイを用いて分析した。クエン酸全血試料を血漿処理まで室温で保った。試料を 2, 000 × g で 15 分間、室温で遠心分離した。血漿を除去し、分析用として輸送するまで -80 °C ですぐに保存した。分析前に、血漿試料を 37 °C で急速に解凍した。凝固反応を開始するために、330 μL のクエン酸血漿を、20 μL 0.2 M (H a e m o n e t i c s C o r p o r a t i o n (B r a i n t r e e , M A)) および 10 μL T

50

F (37℃で最終希釈1:200000)を含有する使い捨てカップ (Haemonetics Corporation, Braintree, MA、カタログ番号6211) に添加した。Innovin (Dade-Behring, Newark, DE) を、組織因子 (TF) 源として使用し、製造業者の推奨通りに水中で再構成し、使用前に0.9%生理食塩水中で1:5555に希釈した。再構成した原液Innovinを4℃で4週間未満保存した。初期血栓形成に対する時間 (R値) を、Haemoscope TEG (登録商標) 5000システム (Haemonetics Corporation, Braintree, MA) を用いて測定した。

【0451】

(出血時間が1回用量の1mg/kg ARC19499により補正された) 第1群のサル由来の血漿試料の群平均R値 (±標準誤差) が表31に示される。血漿試料の時点に対する群平均R値も図示する (図134)。FVIII Abでの処理は、群平均R値を群平均ベースラインR値の約2.8倍に延長するという結果をもたらした。1mg/kg ARC19499でのサルの処理が、FVIII Abでの処理後に得た値から群平均R値を減少させた一方で、このR値は、依然として群平均ベースラインR値の約1.9倍であった。第1群のサルの個別のR値が表32に示され、血漿試料の時点に対する個別のR値も図135に図示する。この群の全てのサルは、FVIII Abの投与に反応して、処理前のそれらのベースラインR値と比較して、R値の延長を示した (1.7~5.1倍の範囲)。この群の1匹を除く全てのサルは、1mg/kg ARC19499の投与に反応して、処理前のそれらのベースラインR値と比較して、R値の減少も示した (1.3~1.8倍の範囲)。1匹のサル、NHP0603477は、1mg/kg ARC19499の投与後に、FVIII Ab注入後のR値と比較して、50%のR値の増加を示し、全血TEG (登録商標) 分析は、その代わりに、1mg/kg ARC19499の投与後に、FVIII Ab注入後のR値と比較して、53%のR値の減少を示した。その全血TEG (登録商標) 分析が1mg/kg ARC19499の投与に反応してR値の微増を示したNHP0701565の血漿TEG (登録商標) 分析は、1mg/kg ARC19499の投与後、FVIII Ab注入後のR値よりも実際には66%下回った。

【表31】

表31. 出血時間が1回用量の1mg/kg ARC19499により補正されたサルの平均血漿TEG (登録商標) R値 (第1群)

第1群:平均血漿TEG (登録商標) R値			
	時点	平均	標準誤差
	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	5.4	0.37
FVIII ab 処理の2時間後	120	15	1.6
ARC19499 処理の55分後	210	10	1.7

【表 3 2】

表 3 2. 出血時間が 1 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの個別の血漿 T E G (登録商標) R 値 (第 1 群)

第 1 群:個別の血漿 TEG (登録商標) R 値							
	時点	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP0701 565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	5.0	6.0	4.3	4.6	6.3	6.4
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	12.2	16.6	21.9	15.5	14.1	10.8
ARC1949 9 処理の 55 分後	210	9.2	7.8	7.4	特定され ず	特定され ず	16.2

【 0 4 5 2】

(出血時間が 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正された) 第 2 群のサル由来の血漿試料の群平均 R 値 (±標準誤差) が表 3 3 に示される。血液試料の時点に対する群平均 R 値も図 1 3 6 に図示する。抗 F V I I I 抗体での処理は、群平均 R 値を群平均ベースライン R 値の約 4 . 0 倍に延長するという結果をもたらした。出血時間を補正しなかった A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、群平均 R 値は、群平均ベースライン R 値の約 2 . 2 倍に減少した。この群の出血時間を補正した 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのサルの処理は、F V I I I A b での処理後に得た値から群平均 R 値をさらに著しく減少させなかった。第 2 群のサルの個別の R 値が表 3 4 に示され、血液試料の時点に対する個別の R 値も図 1 3 7 に図示する。この群の全てのサルは、F V I I I A b の投与に反応して、ベースラインでの処理前のそれらのベースライン R 値と比較して、R 値の延長を示した (1 . 1 ~ 6 . 4 倍の範囲)。出血時間を補正しなかった A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、この群の全てのサルの血漿 R 値は、群平均ベースライン R 値を超えて減少した (0 . 5 ~ 4 . 5 倍の範囲)。2 匹のサルの R 値は、依然として処理前のベースラインでの R 値よりも高かったが、この群の出血時間の全てを補正した 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのサルの処理は、変化をもたらさなかったか、あるいは R 値をさらに減少させた (0 . 5 ~ 3 . 2 倍の範囲)。

【表 3 3】

表 3 3. 出血時間が 2 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの平均血漿 T E G (登録商標) R 値 (第 2 群)

第 2 群:平均血漿 TEG (登録商標) R 値			
	時点	平均	標準誤差
	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	5.8	0.6
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	23	6.5
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	13	4.5
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	237	12	3.7

10

【表 3 4】

表 3 4. 出血時間が 2 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの個別の血漿 T E G (登録商標) R 値 (第 2 群)

第 2 群:個別の血漿 TEG (登録商標) R 値					
	時点	NHP06103 01	NHP07022 77	HP0611655	NHP05110 11
	(分)	(分)	(分)	(分)	(分)
ベースライン	-10	4.6	7.2	5.3	6.0
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	15.4	8.1	33.9	33.7
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	7.6	3.5	23.7	16.8
ARC19499 処理の 12 分後	237	特定されず	3.9	17.2	16.5

20

30

【0 4 5 3】

第 3 群のサル由来の血漿試料の R 値が表 3 5 に示され、血液試料の時点に対する R 値も図 1 3 8 に図示する。このサルは、F V I I I A b の投与に反応して、その R 値をそのベースライン R 値の 3 . 5 倍に延長させることを示した。出血時間を補正しなかった A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、R 値は、ベースライン R 値の 1 . 3 倍に減少した。このサルの出血時間も補正しなかった 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのこのサルの処理は、R 値をベースライン R 値の 1 . 1 倍にさらに減少させた。出血時間を補正した追加用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 は、R 値をベースライン R 値の 0 . 9 倍に減少させた。

40

【表 3 5】

表 3 5. 出血時間が 3 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されたサルの血漿 T E G (登録商標) R 値 (第 3 群)

第 3 群:血漿 TEG (登録商標) R 値		
	時点	NHP0702073
	(分)	(分)
ベースライン	-10	4.7
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	16.4
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	6.2
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	239	5.2
第 3 の ARC19499 処理の 12 分後	278	4.4

10

【 0 4 5 4】

第 4 群のサル由来の血漿試料の R 値が表 3 6 に示され、血液試料の時点に対する R 値も図 1 3 9 に図示する。このサルは、F V I I I A b の投与に反応して、そのベースライン R 値の 2 . 9 倍に延長させることを示した。出血時間を補正しなかった A R C 1 9 4 9 9 の 1 m g / k g 用量での処理に反応して、R 値は、ベースライン R 値を超えてベースライン R 値の 1 . 1 倍に減少する。このサルの出血時間も補正しなかった 2 回用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 でのこのサルの処理後に採取した血液からの血漿は、ベースライン R 値の 1 . 2 倍よりもわずかに高い R 値を示した。依然として出血時間を補正しなかった追加用量の 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 は、ベースライン R 値の 1 . 0 倍強にわずかに R 値を減少させた。第 4 の 3 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 用量は、処理前のベースラインを下回って R 値を減少させた (処理前のベースライン R 値の 0 . 9 倍)。先の評価で使用した静脈と一致した十分な利用可能な静脈を欠如するため、この動物においてさらなる出血時間の評価を行うことができなかった。

20

【表 3 6】

表 3 6. 出血時間が 3 回用量の 1 mg / k g A R C 1 9 4 9 9 により補正されなかったサルの血漿 T E G (登録商標) R 値 (第 4 群)

30

第 4 群:血漿 TEG (登録商標) R 値		
	時点	NHP0607367
	(分)	(分)
ベースライン	-10	6.4
FVIII ab 処理の 2 時間後	120	18.5
第 1 の ARC19499 処理の 55 分後	210	6.8
第 2 の ARC19499 処理の 12 分後	237	7.5
第 3 の ARC19499 処理の 12 分後	264	6.2
第 4 の ARC19499 処理の 12 分後	296	5.8

40

【 0 4 5 5】

上述の実施例は、F V I I I A b で処理したサルが、伏在静脈の穿刺後に長引く出血を呈し、血友病の特徴である長引く出血との一致が観察された。この研究で試験したサルの大多数 (1 2 匹中 1 1 匹) において、最大 3 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 での処理がこの長引く出血時間を補正した。それらのサルの 6 匹のみが、この補正を呈するために 1 m g / k g A R C 1 9 4 9 9 の 1 回用量を必要とし、他の 4 匹のサルの出血時間は、2 回

50

用量の 1 mg/kg ARC19499 で補正された。これらのサル由来の全血の TEG（登録商標）分析の R 値は、FVIIIAb 投与後に予期された上昇を示し、この上昇は、ARC19499 での処理後にベースラインレベルに向かって減少し、同様のパターンがこれらの血液試料からの血漿の分析において見られた。これらのデータは、ARC19499 が、誘発された血友病のモデルにおいて長引く出血を補正することができることを示し、インヒビターおよび非インヒビター血友病 A 患者の治療における成功した治療薬としての ARC19499 の可能性のある臨床的有用性を支援する。

【0456】

実施例 34

本実施例は、アプタマー医薬品化学を通じた、ARC17480 において耐性を示す置換および耐性を示さない置換の評価である。

10

【0457】

以下の表 37 ならびに図 140 および図 141 に示されるように、ARC17480 内の残基の 2' 位またはリン酸骨格内での修飾を用いて試験するために、分子を生成した。ARC17480 内のそれぞれ個々の 2' -デオキシ残基を、対応する 2' -メトキシまたは 2' -フルオロを含有する残基により置換し、それぞれ ARC18538 - ARC18541 および ARC19493 - ARC19496 を得た（図 140）。追加的に、ARC17480 内の 9、14、16、および 25 位の 4 つのデオキシチジン残基に、2' -デオキシから 2' -メトキシおよび／または 2' -デオキシから 2' -フルオロの複数の残基を有するいくつかの分子を生成し、ARC18545、ARC18546、ARC18549、ARC19476、ARC19477、ARC19478、ARC19484、ARC19490、および ARC19491 を得た（図 140）。ARC17480 内のそれぞれ個々の 2' -メトキシ残基を対応する 2' -デオキシ残基により置換し、2' -メトキシウリジン残基を 2' -デオキシチミンおよび 2' -デオキシウリジンの両方の残基で置換して、ARC19448 - ARC19475 および ARC33867 - ARC33877 を得た（図 140）。ARC17480 内の各ヌクレオチド対の間のリン酸塩を、個々にホスホロチオエートで置換し、ARC19416 - ARC19447 を得た（図 141）。

20

【0458】

修飾された ARC17480 分子を、結合および機能についてアッセイした。本評価に使用されたアッセイは、自動較正トロンビン生成（CAT）アッセイ、ドットプロット結合競合アッセイ、および FXa 活性アッセイであった。これらのアッセイの結果を表 37 に要約し、図 142 に示す。置換は、行われた 3 つのアッセイのうちの少なくとも 2 つの基準を満たす場合、活性に対して耐性を示すと見なされた。耐性を示した（「満たす」）、および耐性を示さなかった（「満たさない」）置換を、表 37 に特定する。各アッセイに使用された実験詳細および基準を、以下の段落に記載する。

30

【0459】

各分子の TFPi 阻害活性を、CAT アッセイで、500 nM、166.67 nM、55.56 nM、18.52 nM、6.17 nM、および 2.08 nM のアプタマー濃度で、プールした血友病 A 血漿中で評価した。ARC17480 を対照として全ての実験に含めた。各分子について、各アプタマー濃度の内因性トロンビン生成能（ETP）およびピークトロンビン値を分析に使用した。血友病 A 血漿のみの ETP またはピークトロンビン値を、各濃度での各分子について、アプタマーの存在下での対応する値から減算した。次いで、補正した ETP およびピーク値をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\text{max} / (1 + \text{IC}_{50} / x)) + \text{int}$ （式中、 y = ETP またはピークトロンビン、 x = アプタマーの濃度、 max = 最大 ETP またはピークトロンビン、および int = y 切片）に当てはめて、ETP およびピークトロンビン双方についての IC_{50} 値を生成した。各アプタマーの IC_{50} を、同一の実験で評価された ARC17480 の IC_{50} と比較した。置換は、CAT アッセイにおいて、その分子の ETP およびピークトロンビン双方の IC_{50} が、同一の実験で評価された ARC17480 のものの 5 倍を超えな

40

50

れば、耐性を示すと見なされた。耐性を示す置換を、アッセイ基準を満たす（「満たす」）、またはアッセイ基準を満たさない（「満たさない」）として、表37に示す。

【0460】

各分子を、組織因子経路阻害剤（TFPI）への結合について、結合競合アッセイで評価した。これらの実験について、10 nMのヒトTFPI（American Diagnostica, Stamford, CT、カタログ番号4500PC）を、微量の放射標識したARC17480、ならびに5000 nM、1666.67 nM、555.56 nM、185.19 nM、61.73 nM、20.58 nM、6.86 nM、2.29 nM、0.76 nM、または0.25 nMの非標識の競合アプタマーとともにインキュベートした。ARC17480を、対照として全ての実験で、競合相手として含めた。各分子について、各競合アプタマー濃度で結合した放射標識したARC17480の割合を分析に使用した。結合した放射標識したARC17480の割合をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\max / (1 + x / IC_{50})) + \text{int}$ （式中、 y = 結合した放射標識したARC17480の割合、 x = アプタマーの濃度、 $\max$ = 最大の結合した放射標識したARC17480、および $\text{int} = y$ 切片）に当てはめて、結合競合についての IC_{50} 値を生成した。各アプタマーの IC_{50} を、同一の実験で評価されたARC17480の IC_{50} と比較した。置換は、結合競合アッセイにおいて、その分子の IC_{50} が同一の実験で評価されたARC17480のものの5倍を超えなければ、耐性を示すと見なされた。耐性を示す置換を、アッセイ基準を満たす（「満たす」）、またはアッセイ基準を満たさない（「満たさない」）として、表37に示す。

10

20

【0461】

各分子を、第Xa因子（FXa）活性アッセイでTFPIの阻害について評価した。FXaの発色基質を切断する能力を、TFPIの存在および不在下で、アプタマーを添加して、または添加せずに測定した。これらの実験のために、2 nMのヒトFXaを8 nMのヒトTFPIとともにインキュベートした。次いで、500 μ Mの発色基質およびアプタマーを添加し、この基質のFXa切断を、時間の関数として405 nmの吸光度（ A_{405} ）で測定した。アプタマーを、500 nM、125 nM、31.25 nM、7.81 nM、1.95 nM、および0.49 nMの濃度で試験した。ARC17480を対照として各実験に含めた。各アプタマー濃度について、 A_{405} を時間の関数としてプロットし、各曲線の直線領域を等式 $y = mx + b$ （式中、 $y = A_{405}$ 、 x = アプタマー濃度、 m = 基質の切断速度、および $b = y$ 切片）に当てはめて、FXa基質の切断速度を生成した。TFPIの存在下、およびアプタマーの不在下でのFXa基質の切断速度を、各濃度の各分子について、TFPIおよびアプタマー双方の存在下での対応する値から減算した。次いで、補正した速度をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (V_{\max} / (1 + IC_{50} / x))$ （式中、 y = 基質の切断速度、 x = アプタマーの濃度、および $V_{\max}$ = 基質の最大切断速度）に当てはめて、 IC_{50} 値および最大（ $V_{\max}$ ）値を生成した。各アプタマーの IC_{50} 値および $V_{\max}$ 値を、同一の実験で評価されたARC17480の IC_{50} 値および $V_{\max}$ 値と比較した。置換は、FXa活性アッセイにおいて、その分子の IC_{50} が同一の実験で評価されたARC17480のものの5倍を超えず、かつ $V_{\max}$ 値が同一の実験で評価されたARC17480の $V_{\max}$ 値の80%より低くなければ、耐性を示すと見なされた。耐性を示す置換を、アッセイ基準を満たす（「満たす」）、またはアッセイ基準を満たさない（「満たさない」）として、表37に示す。

30

40

【0462】

本実施例は、ARC17480内の複数の個々の2'置換が結合および活性に対して耐性を示し、2'置換のいくつかの組み合わせもまた耐性を示すことを示す（表37および図142）。本実施例はまた、ホスホロチオエート置換が、ARC17480内の各ヌクレオチド対間で耐性を示すことも示す（表37）。ARC17480内の耐性を示す2'置換および／またはホスホロチオエート置換のさらなる組み合わせが、結合および活性について耐性を示す可能性が高い。

50

【表 3 7 - 1】

表 3 7 : ARC 1 7 4 8 0 内で耐性を示す置換および耐性を示さない置換

			基準を満たすか?			
配列 番号	ARC 番号	配列(5'→3') (3T=逆位の dT、s=ホスホロチオ エート、mN=2'-メトキシを含有す る残基、dN=デオキシ残基、fN=2'- フルオロを含有する残基)	CAT アッ セイ	結合競合 アッセイ	FXa 活 性アッ セイ	耐性を示 す置換
19	18538	mGmGmAmAmUmAmUmAmCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たさな い	満たさ ない	満たさな い
20	18539	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
21	18540	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUmCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たさ ない	満たす
22	18541	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たさ ない	満たす
23	19493	mGmGmAmAmUmAmUmAfCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たさな い	満たさ ない	満たさな い
24	19494	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGfCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 2】

25	19495	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUfCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
26	19496	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGfCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
27	19448	dGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
28	19449	mGdGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
29	19450	mGmGdAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
30	19451	mGmGmAdAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
31	19452	mGmGmAmAdTmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
32	19453	mGmGmAmAmUdAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
33	19454	mGmGmAmAmUmAdTmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 3】

34	19455	mGmGmAmAmUmAmUdAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
35	19456	mGmGmAmAmUmAmUmAdCdT mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たす	満たさ ない	満たさな い
36	19457	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU dTmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
37	19458	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUdGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
38	19459	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGdGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
39	19460	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCdTdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
40	19461	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCdGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
41	19462	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGdTmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た さな い	満たす	満たさ ない	満たさな い
42	19463	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUdTmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 4】

43	19464	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUdAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
44	19465	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmAd GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
45	19466	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGdGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
46	19467	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGdTmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
47	19468	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUdGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
48	19469	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCdGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たさな い	満たす	満たさな い
49	19470	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGdTmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
50	19471	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUdAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
51	19472	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAdTmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 5】

52	19473	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUdA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
53	19474	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA dTmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
54	19475	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUdA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
55	33867	mGmGmAmAdUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
56	33868	mGmGmAmAmUmAdUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
57	33869	mGmGmAmAmUmAmUmAdCdU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たさな い	満たさ ない	満たさな い
58	33870	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU dUmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たさな い	満たす	満たす
59	33871	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCdUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
60	33872	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGdUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 6】

61	33873	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUdUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
62	33874	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGdUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
63	33875	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGdUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
64	33876	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAdUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
65	33877	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA dUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
66	18545	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUmCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たさ ない	満たす
8	18546	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
67	18549	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUmCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たさ ない	満たす
68	19476	mGmGmAmAmUmAmUmAfCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 7】

69	19477	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUfCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
70	19478	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGfCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た さな い	満たす	満たす	満たす
71	19484	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGfCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGmCmGmUmAmUmAm UmA3T	満た す	満たさな い	満たす	満たす
72	19490	mGmGmAmAmUmAmUmAfCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たさ ない	満たす
73	19491	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUfCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
74	19416	mGsmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
75	19417	mGmGsmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
76	19418	mGmGmAsmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
77	19419	mGmGmAmAsmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 8】

78	19420	mGmGmAmAmUsmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
79	19421	mGmGmAmAmUmAsmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
80	19422	mGmGmAmAmUmAmUsmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たさ ない	満たす
81	19423	mGmGmAmAmUmAmUmAsdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
82	19424	mGmGmAmAmUmAmUmAdCsm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
83	19425	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU smUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
84	19426	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUsmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
85	19427	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGsmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
86	19428	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGsdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 9】

87	19429	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCsmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
88	19430	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUsdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
89	19431	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCsmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
90	19432	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGsmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
91	19433	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUsmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
92	19434	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUsmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
93	19435	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmAs mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
94	19436	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGsmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす
95	19437	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGsmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満た す	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 7 - 1 0】

96	19438	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUsmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
97	19439	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGsdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
98	19440	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCsmGmUmAmUm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
99	19441	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGsmUmAmUm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
100	19442	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUsmAmUm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
101	19443	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUasmUm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
102	19444	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUsm AmUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
103	19445	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA smUmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す
104	19446	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUsmA3T	満 た す	満 た す	満 た す	満 た す

10

20

30

40

【表 3 7 - 1 1】

105	19447	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmAs3T	満た す	満たす	満たす	満たす
-----	-------	---	---------	-----	-----	-----

【0 4 6 3】

実施例 3 5

本実施例は、A R C 1 7 4 8 0 内で耐性を示す欠失および耐性を示さない欠失の評価である。

10

【0 4 6 4】

以下の表 3 8 および図 1 4 3 に示されるように、A R C 1 7 4 8 0 配列内で欠失された単一または複数の残基を用いて試験するために、分子を生成した。A R C 1 7 4 8 0 内のそれぞれ個々の残基を 1 つずつ欠失させて、A R C 3 2 3 0 1、A R C 3 3 1 2 0 ~ A R C 3 3 1 4 3、および A R C 1 8 5 5 5 を得た。2 つの隣接するヌクレオチドが同一である場合は、対応する二重欠失も生成し、A R C 3 2 3 0 2、および A R C 3 3 1 4 4 ~ A R C 3 3 1 4 8 を得た。さらに、複数の欠失を有する分子を生成して、A R C 3 2 3 0 3、A R C 3 2 3 0 5、A R C 3 2 3 0 6、A R C 3 2 3 0 7、A R C 3 3 8 8 9、A R C 3 3 8 9 0、A R C 3 3 8 9 1、A R C 3 3 8 9 5、A R C 3 3 9 0 0、および A R C 3 3 9 0 7 を得た。

20

【0 4 6 5】

欠失を有する A R C 1 7 4 8 0 分子を、結合および機能についてアッセイした。本評価に使用されたアッセイは、自動較正トロンビン生成 (C A T) アッセイ、ドットプロット結合競合アッセイ、および F X a 活性アッセイであった。これらのアッセイの結果を表 3 8 および図 1 4 4 に要約する。置換は、行われた 3 つのアッセイのうちの少なくとも 2 つの基準を満たす場合、活性に対して耐性を示すと見なされた。耐性を示した (「満たす」)、および耐性を示さなかった (「満たさない」) 置換を、表 3 8 に特定する。各アッセイに使用された実験詳細および基準を、以下の段落に記載する。

【0 4 6 6】

各分子の T F P I 阻害活性を、C A T アッセイで、5 0 0 n M、1 6 6 . 6 7 n M、5 5 . 5 6 n M、1 8 . 5 2 n M、6 . 1 7 n M、および 2 . 0 8 n M のアプタマー濃度で、プールした血友病 A 血漿中で評価した。A R C 1 7 4 8 0 を対照として全ての実験に含めた。各分子について、各アプタマー濃度の内因性トロンビン生成能 (E T P) およびピークトロンビン値を分析に使用した。血友病 A 血漿のみの E T P またはピークトロンビン値を、各濃度での各分子について、アプタマーの存在下での対応する値から減算した。次いで、補正した E T P およびピーク値をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (max / (1 + IC_{50} / x)) + int$ (式中、 $y = E T P$ またはピークトロンビン、 $x =$ アプタマーの濃度、 $max =$ 最大 E T P またはピークトロンビン、および $int = y$ 切片) に当てはめて、E T P およびピークトロンビン双方についての IC_{50} 値を生成した。各アプタマーの IC_{50} を、同一の実験で評価された A R C 1 7 4 8 0 の IC_{50} と比較した。置換は、C A T アッセイにおいて、その分子の E T P およびピークトロンビン双方の IC_{50} が、同一の実験で評価された A R C 1 7 4 8 0 のものの 5 倍を超えなければ、耐性を示すと見なされた。耐性を示す置換を、アッセイ基準を満たす (「満たす」)、またはアッセイ基準を満たさない (「満たさない」) として、表 3 8 に示す。

30

40

【0 4 6 7】

各分子を、組織因子経路阻害剤 (T F P I) への結合について、結合競合アッセイで評価した。これらの実験について、1 0 n M のヒト T F P I (A m e r i c a n D i a g n o s t i c a, S t a m f o r d, C T、カタログ番号 4 5 0 0 P C) を、微量の放射標識した A R C 1 7 4 8 0、ならびに 5 0 0 0 n M、1 6 6 6 . 6 7 n M、5 5 5 . 5 6 n

50

M、185.19 nM、61.73 nM、20.58 nM、6.86 nM、2.29 nM、0.76 nM、または0.25 nMの非標識の競合アプタマーとともにインキュベートした。ARC17480を、対照として全ての実験で、競合相手として含めた。各分子について、各競合アプタマー濃度で結合した放射標識したARC17480の割合を分析に使用した。結合した放射標識したARC17480の割合をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (\text{max} / (1 + x / \text{IC}_{50})) + \text{int}$ (式中、 y = 結合した放射標識したARC17480の割合、 x = アプタマーの濃度、 max = 最大の結合した放射標識したARC17480、および $\text{int} = y$ 切片) に当てはめて、結合競合についての IC_{50} 値を生成した。各アプタマーの IC_{50} を、同一の実験で評価されたARC17480の IC_{50} と比較した。置換は、結合競合アッセイにおいて、その分子の IC_{50} が同一の実験で評価されたARC17480のものの5倍を超えなければ、耐性を示すと見なされた。耐性を示す置換を、アッセイ基準を満たす(「満たす」)、またはアッセイ基準を満たさない(「満たさない」として、表38に示す。

【0468】

各分子を、第Xa因子(FXa)活性アッセイでTFPIの阻害について評価した。FXaの発色基質を切断する能力を、TFPIの存在および不在下で、アプタマーを添加して、または添加せずに測定した。これらの実験のために、2 nMのヒトFXaを8 nMのヒトTFPIとともにインキュベートした。次いで、500 μ Mの発色基質およびアプタマーを添加し、この基質のFXa切断を、時間の関数として405 nmの吸光度(A_{405})で測定した。アプタマーを、500 nM、125 nM、31.25 nM、7.81 nM、1.95 nM、および0.49 nMの濃度で試験した。ARC17480を対照として各実験に含めた。各アプタマー濃度について、 A_{405} を時間の関数としてプロットし、各曲線の直線領域を等式 $y = mx + b$ (式中、 $y = A_{405}$ 、 x = アプタマー濃度、 m = 基質の切断速度、および $b = y$ 切片) に当てはめて、FXa基質の切断速度を生成した。TFPIの存在下、およびアプタマーの不在下でのFXa基質の切断速度を、各濃度の各分子について、TFPIおよびアプタマー双方の存在下での対応する値から減算した。次いで、補正した速度をアプタマー濃度の関数としてプロットし、等式 $y = (V_{\text{max}} / (1 + \text{IC}_{50} / x))$ (式中、 y = 基質の切断速度、 x = アプタマーの濃度、および V_{max} = 基質の最大切断速度) に当てはめて、 IC_{50} 値および最大(V_{max})値を生成した。各アプタマーの IC_{50} 値および V_{max} 値を、同一の実験で評価されたARC17480の IC_{50} 値および最大値と比較した。置換は、FXa活性アッセイにおいて、その分子の IC_{50} が同一の実験で評価されたARC17480のものの5倍を超えず、かつ V_{max} 値が同一の実験で評価されたARC17480の V_{max} 値の80%より低くなければ、耐性を示すと見なされた。耐性を示す置換を、アッセイ基準を満たす(「満たす」)、またはアッセイ基準を満たさない(「満たさない」として、表38に示す。

【0469】

本実施例は、ARC17480内の複数の個々の欠失が結合および活性に対して耐性を示し、欠失のいくつかの組み合わせもまた耐性を示すことを示す(表38および図144)。ARC33889およびARC33895はそれぞれ、それらの5'および3'末端での合計7つの欠失に耐性を示し、25ヌクレオチド長であるコア分子を生じた。ARC17480内の欠失のさらなる組み合わせが、分子中の追加的変化を伴って、または伴わずに、結合および活性に対して耐性を示す可能性がある。

【表 3 8 - 1】

表 3 8 : A R C 1 7 4 8 0 内で耐性を示す欠失および耐性を示さない欠失

			基準を満たすか?			
配列 番号	ARC 番号	配列(5'→3') (3T=逆位の dT、mN=2'-メトキシ を含有する残基、dN=デオキシ残 基)	CAT ア ッセイ	結合競合 アッセイ	FXa 活性 アッセイ	耐性を示 す置換
106	32301	mGmAmAmUmAmUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
107	33120	mGmGmAmUmAmUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
108	33121	mGmGmAmAmAmUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
109	33122	mGmGmAmAmUmUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たす	満たす	満たす

10

20

30

【表 3 8 - 2】

110	33123	mGmGmAmAmUmAmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
111	33124	mGmGmAmAmUmAmUdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
112	33125	mGmGmAmAmUmAmUmAmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
113	33126	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
114	33127	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
115	33128	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
116	33129	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
117	33130	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
118	33131	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い

10

20

30

40

【表 3 8 - 3】

119	33132	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たす	満たさな い
120	33133	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
121	33134	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
122	33135	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
123	33136	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUdCmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
124	33137	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGmGmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
125	33138	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmUmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
126	33139	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmAmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
127	33140	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmUmA mUmA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い

10

20

30

40

【表 3 8 - 4】

128	33141	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmA mUmA3T	満た さ ない	満たす	満たす	満たす
129	33142	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmU mUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
130	33143	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmU mAmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
131	18555	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmGmGmUmGdCmGmUmAmU mAmU3T	満たす	満たす	満たす	満たす
132	32302	mAmAmUmAmUmAdCmUmUm GmGdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
133	33144	mGmGmUmAmUmAdCmUmUm GmGdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
134	33145	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm GmGdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満た さ ない	満た さ な い	満た さ な い	満た さ な い
135	33146	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満た さ ない	満た さ な い	満た さ な い	満た さ な い
136	33147	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満た さ ない	満た さ な い	満た さ な い	満た さ な い

10

20

30

40

【表 3 8 - 5】

137	33148	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmUm AmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満たさ ない	満たさな い	満たさな い	満たさな い
138	32303	mAmUmAmUmAdCmUmUmGm GdCmUdCmGmUmUmAmGmGm UmGdCmGmUmAmUmAmUmA3 T	満たす	満たす	満たす	満たす
139	32305	mGmAmAmUmAmUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mU3T	満たす	満たす	満たす	満たす
140	32306	mAmAmUmAmUmAdCmUmUm GmGdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
141	32307	mAmUmAmUmAdCmUmUmGm GdCmUdCmGmUmUmAmGmGm UmGdCmGmUmAmU3T	満たす	満たす	満たす	満たす
142	33889	mUmAmUmAdCmUmUmGmGdC mUdCmGmUmUmAmGmGmUm GdCmGmUmAmU3T	満たす	満たさな い	満たす	満たす
143	33890	mAmUmAmUmAdCmUmUmGm GdCmUdCmGmUmUmAmGmGm UmGdCmGmUmAmUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
144	33891	mUmAmUmAdCmUmUmGmGdC mUdCmGmUmUmAmGmGmUm GdCmGmUmAmUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
145	33895	mAmUmAdCmUmUmGmGdCmU dCmGmUmUmAmGmGmUmGdC mGmUmAmUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
146	33900	mUmUmAdCmUmUmGmGdCmU dCmGmUmUmAmGmGmUmGdC mGmUmAmUmA3T	満たす	満たす	満たす	満たす

10

20

30

40

【表 3 8 - 6】

147	33907	mGmGmAmAmUmAdCmUmUm GmGdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	満たす	満たす	満たす	満たす
-----	-------	--	-----	-----	-----	-----

50

【0470】

実施例 36

本実施例は、ARC19499の3'を切り詰めた誘導体が、CATアッセイにおいて機能的活性を有することを示す。

【0471】

ARC21383、ARC21385、ARC21387、およびARC21389は、ARC19499に対して、それらの3'末端に連続する単一欠失を有する（表39）。これらの分子は、それらの5'末端が40kDaのPEGでPEG化されている。これらの分子を異なる濃度（300nM～1.2nM）で血友病A血漿に添加し、トロンビン生成を測定した。この実験ではARC19499を対照として使用した。これらの3'を切り詰めた分子は全て、CATアッセイにおいて、内因性トロンビン生成能（ETP、図145A）およびピークトロンビン（図145B）の双方に関して、ARC19499を用いて観察されたものに類似した活性を有した。

【0472】

本実施例は、ARC19499を3'-3Tおよび3つの3'末端コアヌクレオチドの除去により切り詰めることができ、依然としてCATアッセイにおいて親分子ARC19499のものに類似した活性を保持することを示す。

【表39】

表39：3'を切り詰めた種類のARC19499

配列番号	ARC 番号	配列(5'→3') (mN=2'-メトキシを含有する残基、dN=デオキシ残基、nh=アミンリンカー、 PEG40K=40kDaのPEG)
148	21383	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUm A
149	21385	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmU
150	21387	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA
151	21389	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmU

【0473】

実施例 37

本実施例は、組織因子経路阻害剤（TFPI）の1つ以上の部分に少なくとも部分的に結合するか、またはさもないければそれと相互作用するアプタマーを特定するための戦略を説明する。これらの実験のために、標的とされるTFPIの領域を含む部分的TFPIタンパク質またはペプチドが、選択標的として使用される。この種類の実験には、TFPIタンパク質の任意の部分が使用されてもよい。例えば、完全長TFPIのK3およびC末端ドメインのみを含有するTFPIタンパク質（K3-C TFPI、アミノ酸182～2

76) が、選択の標的である。核酸プールを K3-C TFP I とともにインキュベートし、結合を起こさせ、この混合物を分配して結合した核酸を非結合核酸から分離し、結合した核酸をタンパク質から溶出し、増幅する。この過程を、アプタマーが特定されるまで複数のサイクルの間任意で繰り返す。いくつかのサイクルについて、アプタマーが、完全長タンパク質との関連で、このタンパク質の K3-C 末端領域に結合することを保証するために、完全長 TFP I を標的として使用する。これらの実験により、結合エピトープが例えば、このタンパク質の K3-C 末端領域内に含有される、TFP I 結合アプタマーの特定がもたらされる。

【0474】

実施例 38

本実施例は、組織因子経路阻害剤 (TFP I) の 1 つ以上の部分に少なくとも部分的に結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを特定するための戦略を説明する。これらの実験のために、完全長 TFP I が選択標的として使用され、TFP I の一部分または TFP I に結合するリガンドを使用して、TFP I タンパク質の一部分に結合するアプタマーを溶出する。TFP I の一部分のみを含有するタンパク質またはペプチドもまた、選択標的として使用することができる。例えば、溶出のために、TFP I のアミノ酸 150~190 を含むペプチドが使用される。核酸プールを完全長 TFP I とともにインキュベートし、結合を起こさせ、この混合物を分配して結合した核酸を非結合核酸から分離し、結合した核酸を、TFP I 150~190 ペプチドとともにインキュベートすることによりタンパク質から溶出し、増幅する。この過程を、アプタマーが特定されるまで複数のサイクルの間繰り返す。これらの実験により、結合エピトープが例えば、TFP I の 150~190 領域の全てまたは一部を含有する、TFP I 結合アプタマーの特定がもたらされる。

【0475】

実施例 39

本実施例は、組織因子経路阻害剤 (TFP I) の 1 つ以上の部分に少なくとも部分的に結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを特定するための戦略を説明する。これらの実験のために、完全長 TFP I が選択標的として使用され、TFP I に結合するリガンドは、エピトープがアプタマーに結合するのを阻止して、アプタマーがこのタンパク質上の代替部位に結合するのを推進するために、その選択に含まれる。TFP I の一部分のみを含有するタンパク質またはペプチドもまた、選択標的として使用することができる。その阻止リガンドは、選択ステップおよび／または分配ステップに、捕捉方法または洗浄試薬として含まれる。例えば、TFP I の C 末端に結合する抗体がその選択に含まれる。核酸プールをこの抗体の存在下で TFP I とともにインキュベートし、結合を起こさせ、この混合物を分配して結合した核酸を非結合核酸から分離し、結合した核酸をタンパク質から溶出し、増幅する。この過程を、アプタマーが特定されるまで複数のサイクルの間繰り返す。いくつかのサイクルは、分配ステップの間洗浄液中に抗体を含み、いくつかのサイクルは、結合ステップで抗体と併せて、または抗体を含めずに、TFP I-アプタマー複合体を捕捉するための分配方法として抗体を使用する。これらの実験により、結合エピトープが、例えば、TFP I の C 末端の抗体結合領域内に含有されない、TFP I 結合アプタマーの特定がもたらされる。

【0476】

実施例 40

本実施例は、組織因子経路阻害剤 (TFP I) の 1 つ以上の部分に少なくとも部分的に結合するか、またはさもなければそれと相互作用するアプタマーを特定するための戦略を説明する。これらの実験のために、完全長 TFP I が選択標的として使用され、所望の機能的性質を有するアプタマーをその機能的性質を有さない核酸から分離する分配ステップが採用される。TFP I の一部分のみを含有するタンパク質またはペプチドもまた、選択標的として使用することができる。例えば、所望のアプタマーの機能的性質は、第 Xa 因子 (FXa) との TFP I 相互作用の阻害である。これらの実験のために、核酸プー

10

20

30

40

50

ルを、結合を可能にする条件下でTFPIとともにインキュベートし、次いで分配して、TFPIに結合したアプタマーから結合していない核酸を分離する。次いで、TFPIに結合したアプタマーを、疎水性プレートに結合されたFXaとともにインキュベートする。遊離TFPIおよびTFPI-FXa相互作用を妨げないアプタマーと結合したTFPIは、プレート上のFXaに結合し、一方TFPI-FXa相互作用を妨げるアプタマーと結合したTFPIは、プレートに結合しない。次いで、非結合TFPI-アプタマー複合体からのアプタマーを増幅する。この過程を、アプタマーが特定されるまで複数のサイクルの間繰り返す。これらの実験によって、例えば、TFPIとFXaとの間の機能的相互作用の阻害を媒介するTFPIタンパク質の領域に結合するアプタマーの特定がもたらされる。

10

【0477】

実施例41

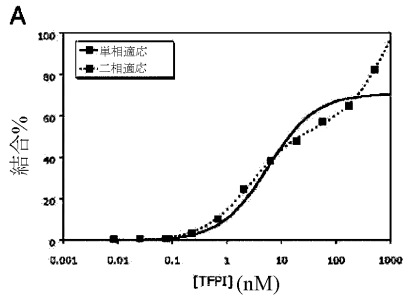
本実施例は、組織因子経路阻害剤（TFPI）の1つ以上の部分に少なくとも部分的に結合するか、またはさもなければそれと相互作用する抗体を特定するための戦略を説明する。抗原は、対象とするTFPIの任意の1つ以上の部分であってもよい。例えば、抗原は、完全長TFPIのK3およびC末端ドメインのみを含有するTFPIタンパク質（K3-C TFPI、アミノ酸182～276）であってもよい。抗原は発現系で発現されるか、自動タンパク質合成機で合成される。次いで、マウスを溶液中の抗原で免疫付与する。次いで、抗体生成細胞を免疫付与されたマウスから単離し、骨髓腫細胞と融合させて、モノクローナル抗体生成ハイブリドーマを形成する。次いで、そのハイブリドーマを選択培地中で培養する。次いで、得られた細胞を連続希釈により播種し、抗原に特異的に結合する抗体の生成についてアッセイする。次いで、選択されたモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを培養する。次いで、抗体をハイブリドーマ細胞の培養培地浮遊物から精製する。これらの実験により、結合エピトープが、例えば、このタンパク質のK3-C末端領域内に含有される、TFPI-結合抗体の特定がもたらされる。

20

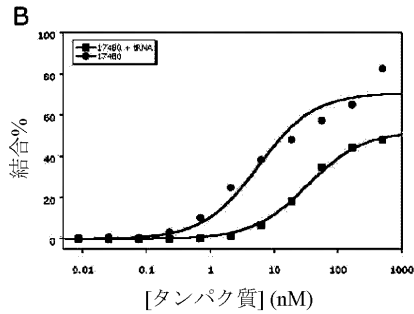
【0478】

これで、本発明を明細書および実施例により説明したが、当業者は、本発明が種々の実施形態で実践され得、上記の説明および実施例が説明を目的とするものであって、以下の特許請求の範囲を限定するものではないことを認識するだろう。

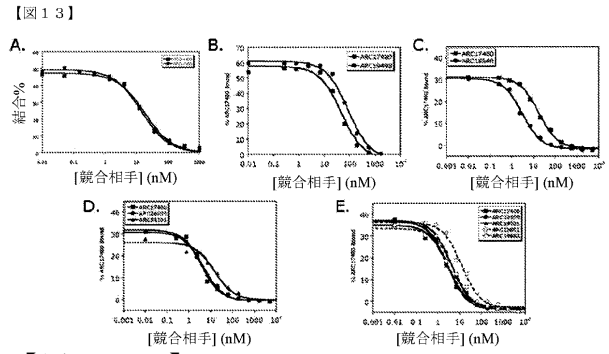
【図 1 2 A】



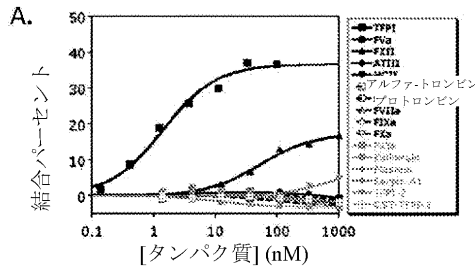
【図 1 2 B】



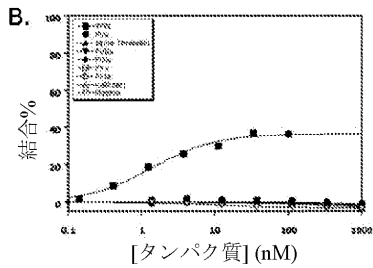
【図 1 3】



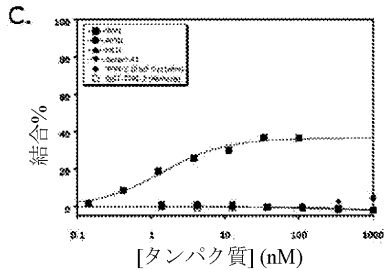
【図 1 4 A】



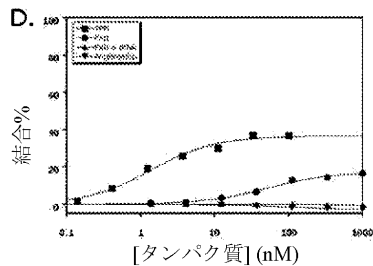
【図 1 4 B】



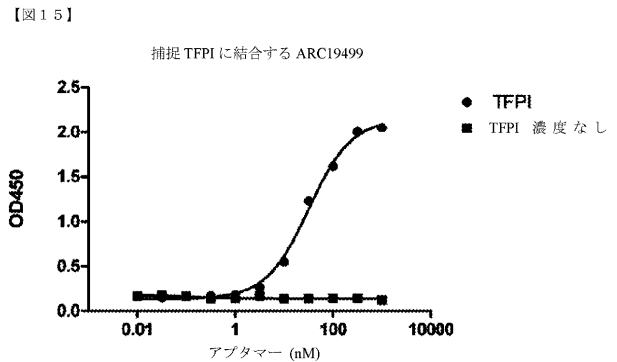
【図 1 4 C】



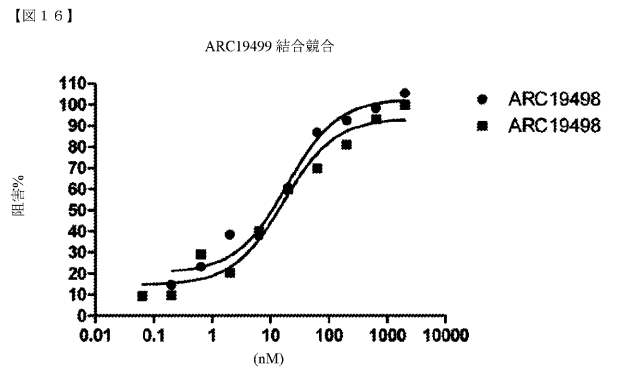
【図 1 4 D】



【図 1 5】



【図 1 6】



A.

Figure 1A is a line graph showing the binding curves of TFP and TFP-His to BSA. The y-axis represents the binding percentage (結合%) from 0 to 100. The x-axis represents the protein concentration [タンパク質] (nM) on a logarithmic scale from 0.1 to 1000. TFP (filled squares) shows higher binding affinity than TFP-His (filled circles).

[タンパク質] (nM)	TFP 結合%	TFP-His 結合%
0.1	0	0
0.5	15	2
1	30	5
5	48	15
10	55	25
50	60	40
100	68	48
500	85	52
1000	95	55

A

結合率/%

■—TFP

◆---Control

[タンパク質] (nM)

[タンパク質] (nM)	結合率/% (TFP)	結合率/% (Control)
0.001	0	0
0.01	0	0
0.1	2	0
0.2	5	0
0.5	18	0
1	28	0
2	42	0
5	48	0
10	55	0
20	62	0
50	78	0
100	90	0

B.

Figure 2B is a line graph showing the binding of various proteins to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) complex. The y-axis represents % Bound (0 to 100) and the x-axis represents [タンパク質] (nM) on a logarithmic scale (0.01 to 10⁵). The legend indicates four data series: 1. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) (solid line with circles) showing high binding affinity. 2. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) + 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) (dashed line with triangles) showing lower binding affinity. 3. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) + 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) (dotted line with squares) showing very low binding affinity. 4. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) + 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate 12,13-dibenzate (TPA) (dash-dot line with diamonds) showing very low binding affinity.

B

ARC17480 結合 %

■ ARC17480 + TFPI (100 nM)

○ ARC17480

[ヘパリン] (nM)

[ヘパリン] (nM)	ARC17480 結合 % (○)	ARC17480 + TFPI 結合 % (■)
0.1	55	60
0.2	50	50
0.5	48	40
1	45	18
2	42	5
5	35	2
10	25	1
20	15	0.5
50	5	0.2
100	2	0.1
200	1	0.1
500	0.5	0.1
1000	0.5	0.1
2000	0.5	0.1

【図19】

A TFPIへのARC19499結合の競合

阻害パーセント

[アプタマーまたは抗体] nM 単位

● 19498
■ AD4903
□ AD4904
▲ 7035-A01

B TFPIへのARC19499結合の競合

阻害パーセント

[アプタマーまたは抗体] nM 単位

● ARC19498
■ ACJ-K-1
□ ACJ-K-2
▲ ACJ-K-3
□ ACJ-K-4
▲ ACJ-K-5

【図 2】

A.

速度 (mOD/分)

期間 (分)

● TFPFなし
○ TFPFのみ
▲ 0.01 nM 14999
△ 0.1 nM 14999
■ 1 nM 14999
□ 10 nM 14999
◆ 100 nM 14999
◇ 1000 nM 14999

B.

4分経過における14999誘発のCa²⁺の増加量との相対値

14999 (nM)

● 14999
○ No TFPF
□ TFPFあり

Figure 2 consists of three panels (A, B, and C) showing the binding of ARC17480 to various proteins. The y-axis for all panels is '結合%' (Binding %) and the x-axis is '[結合相手] (nM)' (Binding partner (nM)) on a logarithmic scale.

Panel A: Binding to ACN-1, ACN-2, and ACN-3. The legend indicates:

- ARC17480 (filled squares)
- ACN-1 (filled circles)
- ACN-2 (filled triangles)
- ACN-3 (open triangles)

 Binding to ACN-1 and ACN-2 is high (around 40-50%) and relatively constant across the concentration range. Binding to ACN-3 shows a sharp decrease starting around 10 nM, reaching near 0% by 1000 nM.

Panel B: Binding to ACN-4 and ACN-5. The legend indicates:

- ARC17480 (filled squares)
- ACN-4 (filled circles)
- ACN-5 (filled triangles)

 Binding to ACN-4 and ACN-5 is high (around 30-35%) and relatively constant across the concentration range. Binding to ACN-5 shows a sharp decrease starting around 10 nM, reaching near 0% by 1000 nM.

Panel C: Binding to AD-903 and AD-904. The legend indicates:

- ARC17480 (filled squares)
- AD-903 (filled circles)
- AD-904 (filled triangles)

 Binding to AD-903 and AD-904 is high (around 35-40%) and relatively constant across the concentration range. Binding to AD-904 shows a sharp decrease starting around 10 nM, reaching near 0% by 1000 nM.

【図 2】

A.

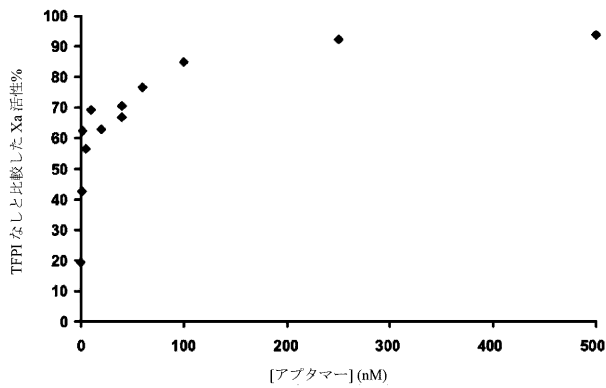
B.

C.

【図 2 3】

【図 2 3】

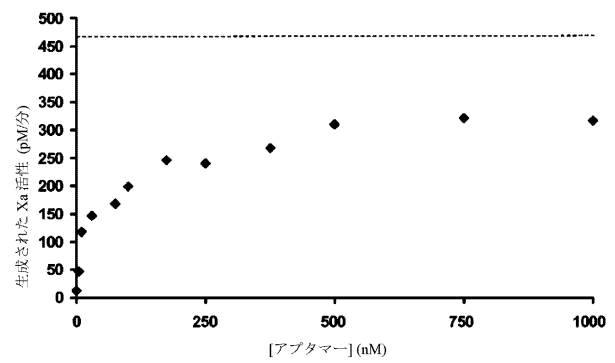
アプタマー滴定 (1nM Xa/2.5nM TFPI)



【図 2 4】

【図 2 4】

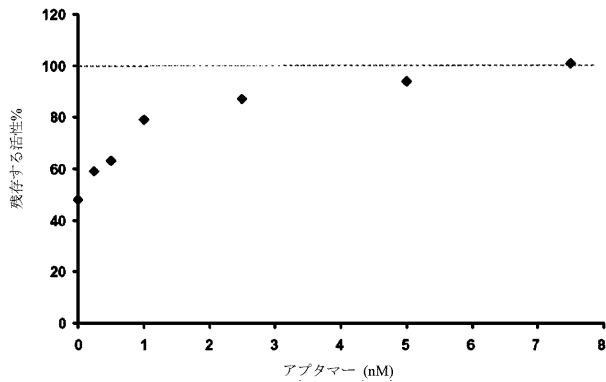
Xase (20pM TF/20μM PCPS/1nM VIIa/1μM X/2.5nM TFPI)



【図 2 5】

【図 2 5】

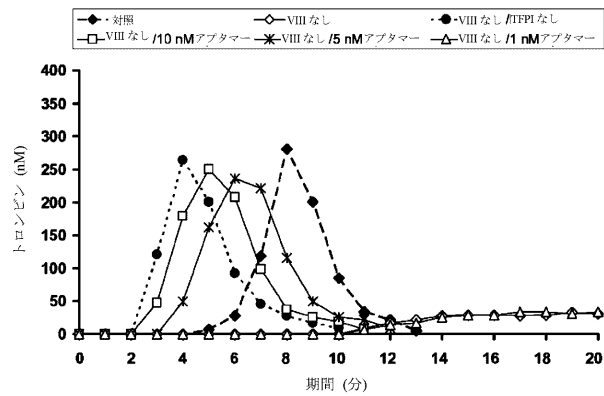
蛍光アッセイ (1nM TF/2nM VIIa/8nM TFPI)



【図 2 7】

【図 2 7】

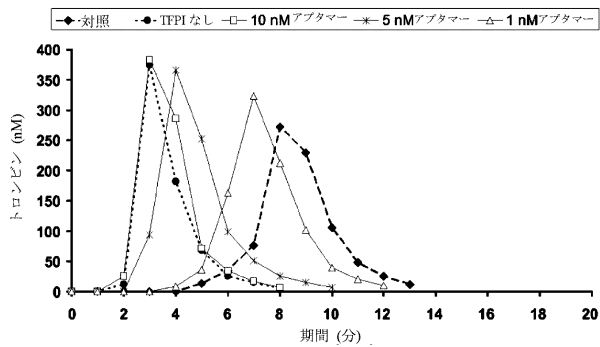
血友病 A プロテオーム (VIII なし)



【図 2 6】

【図 2 6】

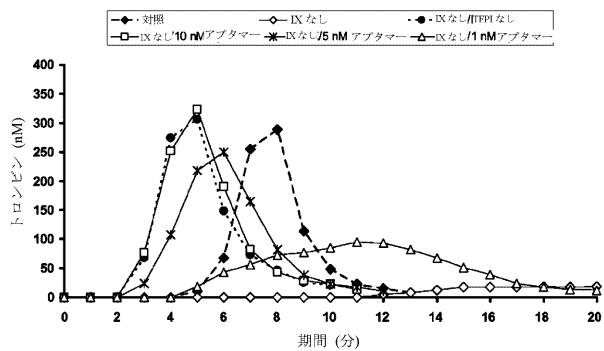
正常な合成凝固プロテオーム



【図 2 8】

【図 2 8】

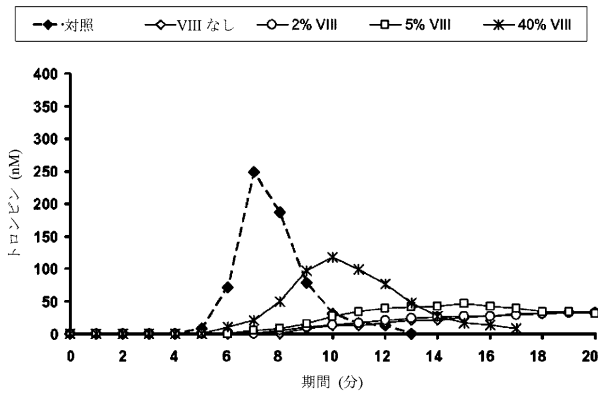
血友病 B プロテオーム (NO IX)



【図 29】

【図 29】

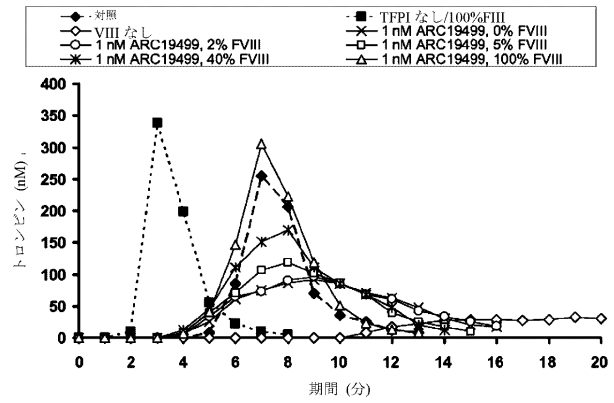
SCP, ARC19499 なし



【図 30】

【図 30】

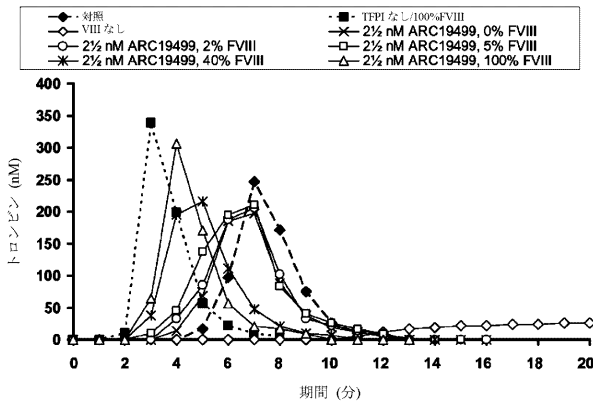
SCP, 1nM の ARC19499



【図 31】

【図 31】

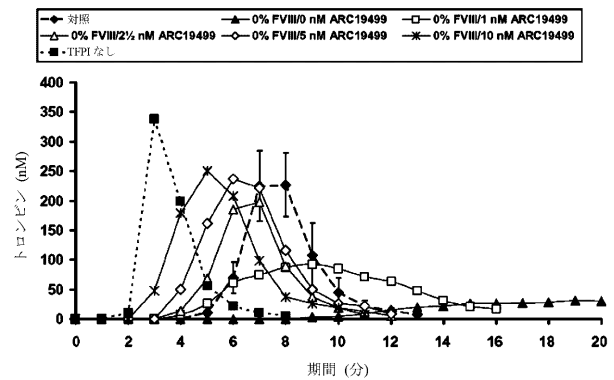
SCP, 2 1/2nM の ARC19499



【図 32】

【図 32】

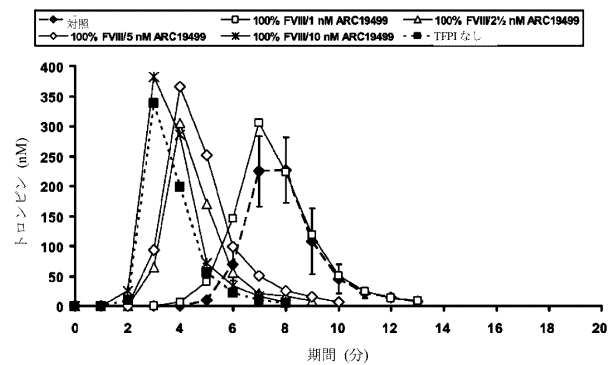
SCP, ARC19499: 0% FVIII



【図 33】

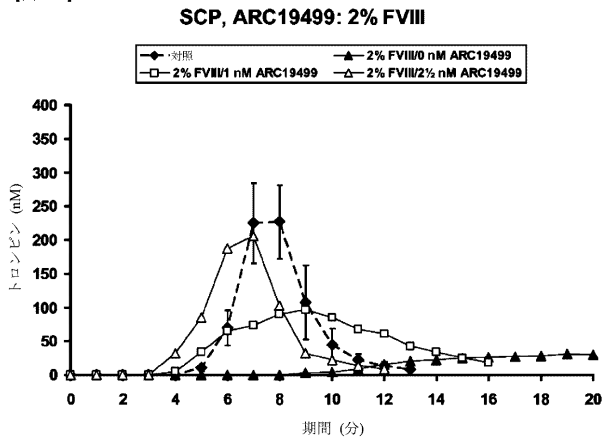
【図 33】

SCP, ARC19499: 100% FVIII



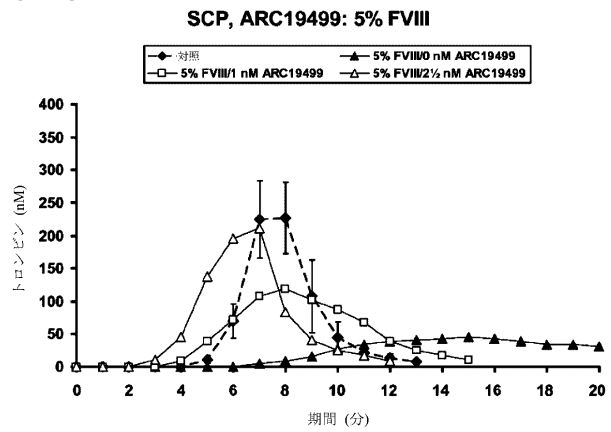
【図 3 4】

【図 3 4】



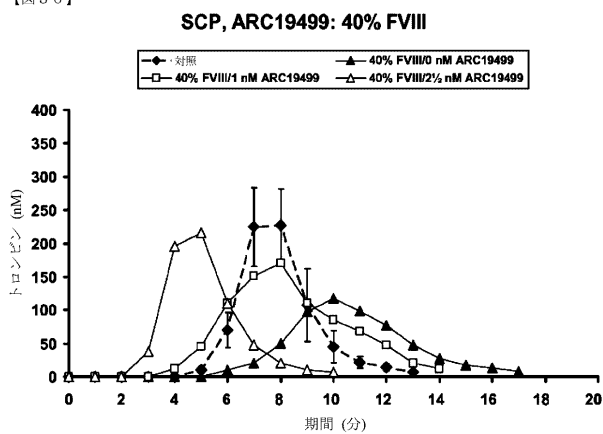
【図 3 5】

【図 3 5】

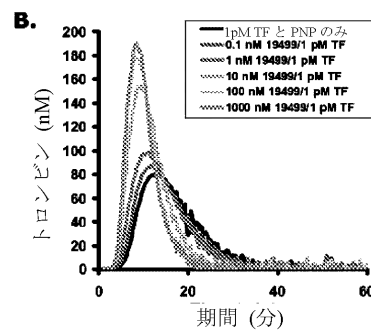


【図 3 6】

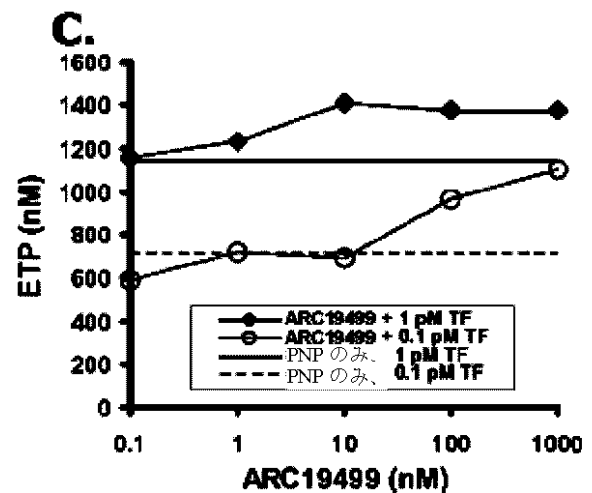
【図 3 6】



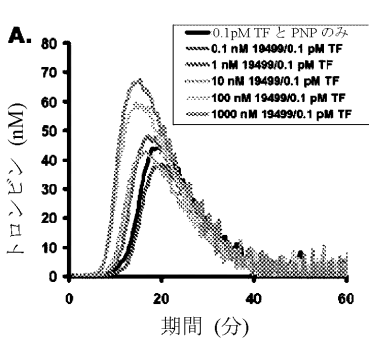
【図 3 7 B】



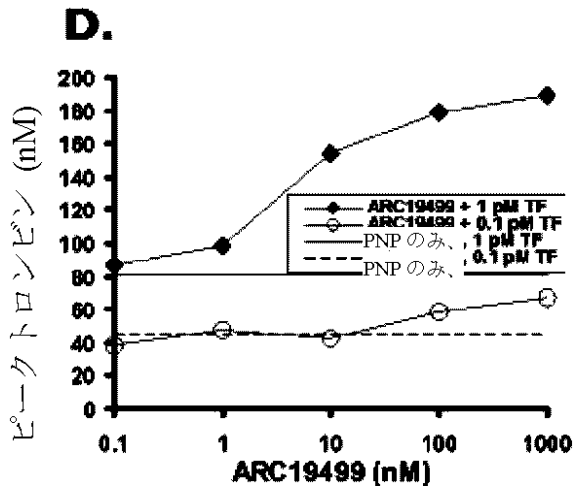
【図 3 7 C】



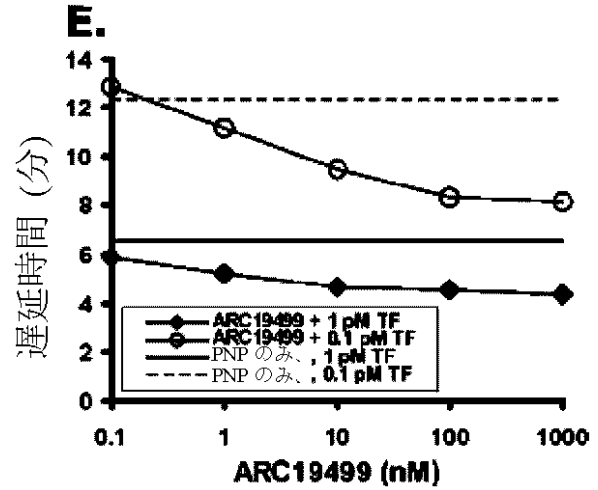
【図 3 7 A】



【図 3 7 D】

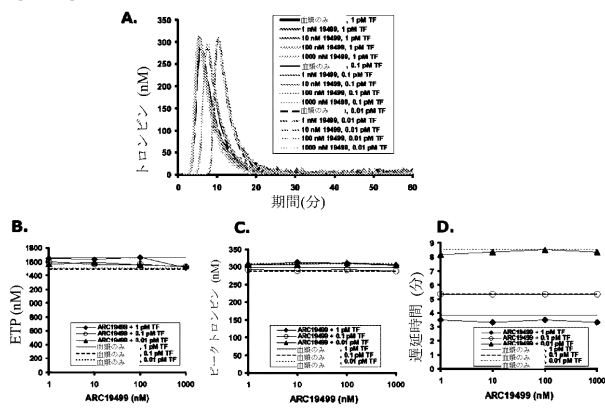


【図 3 7 E】

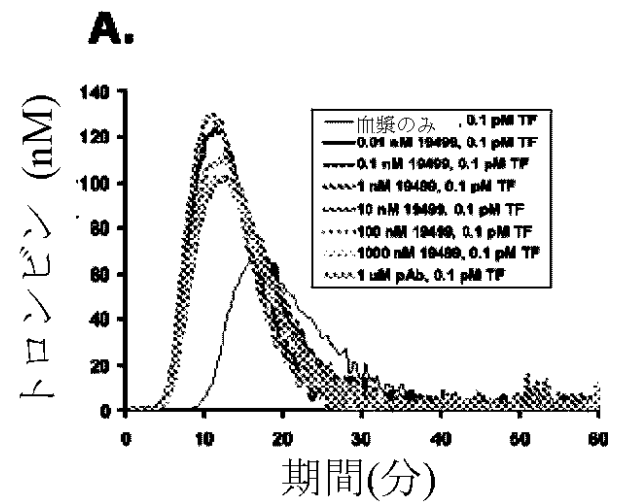


【図 3 8】

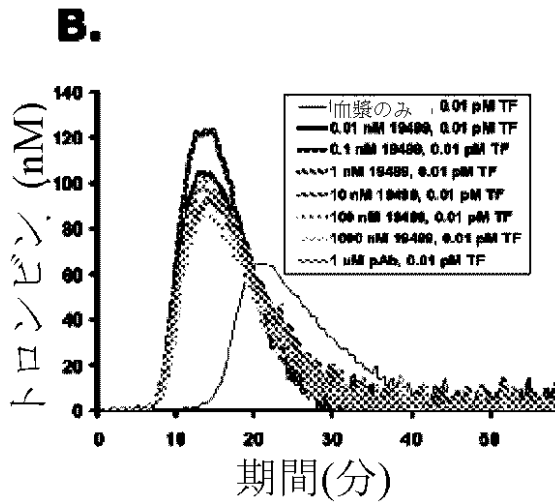
【図 3 8】



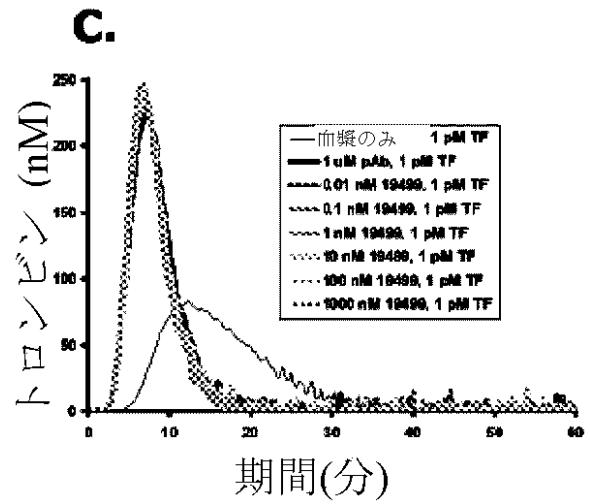
【図 3 9 A】



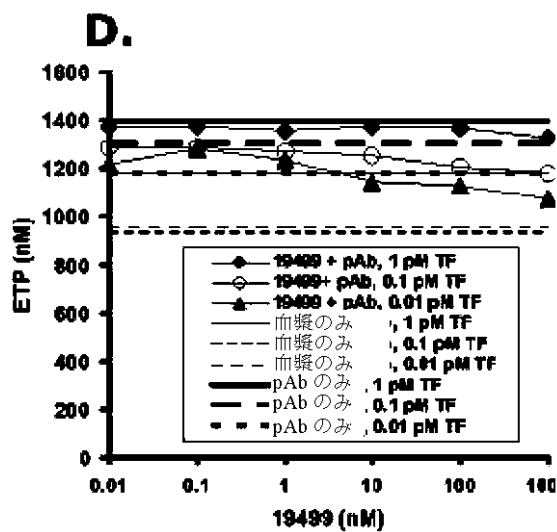
【図 3 9 B】



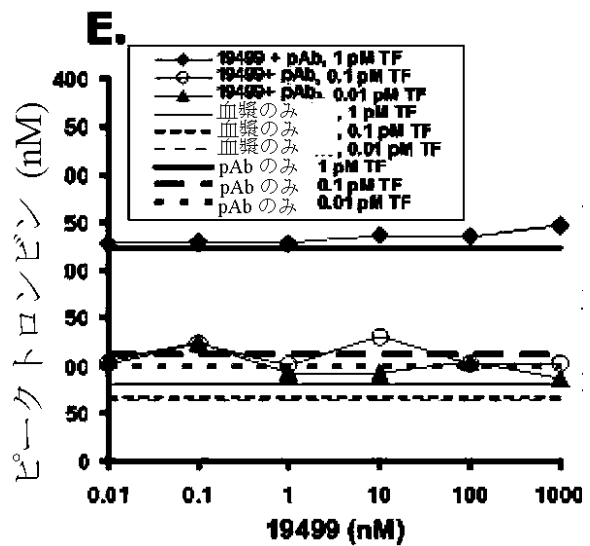
【図 3 9 C】



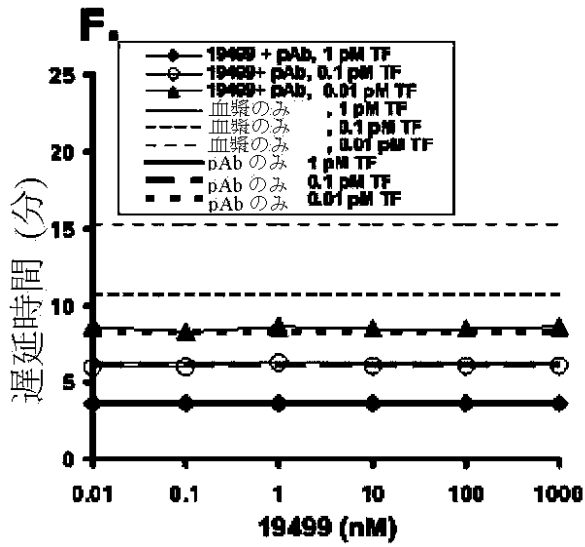
【図 3 9 D】



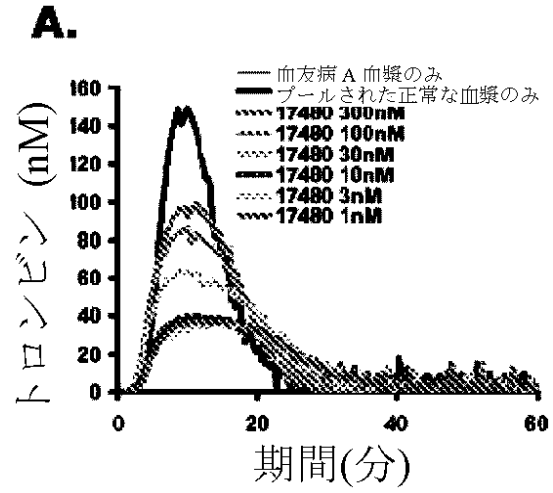
【図 3 9 E】



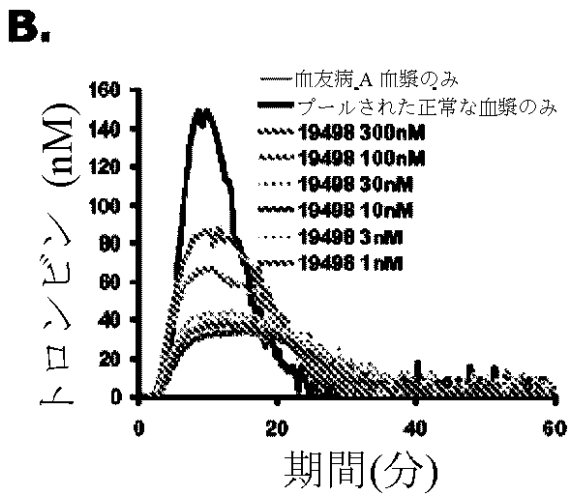
【図 3 9 F】



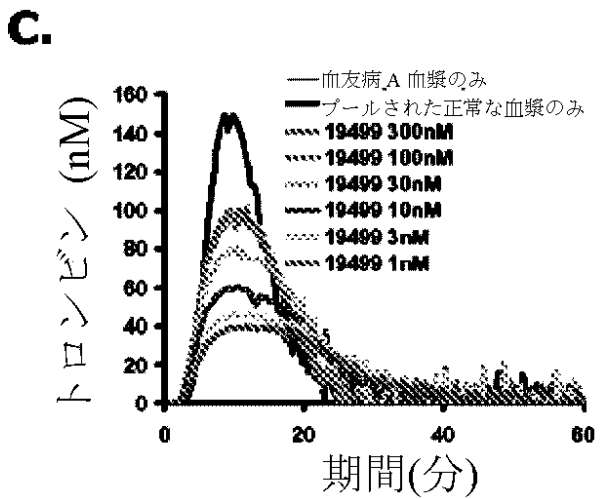
【図 4 0 A】



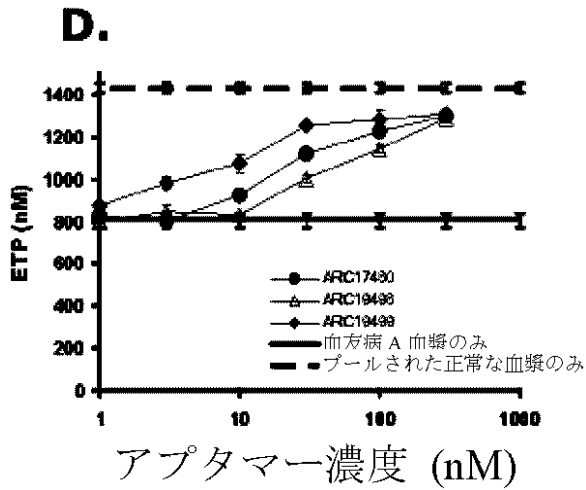
【図 4 0 B】



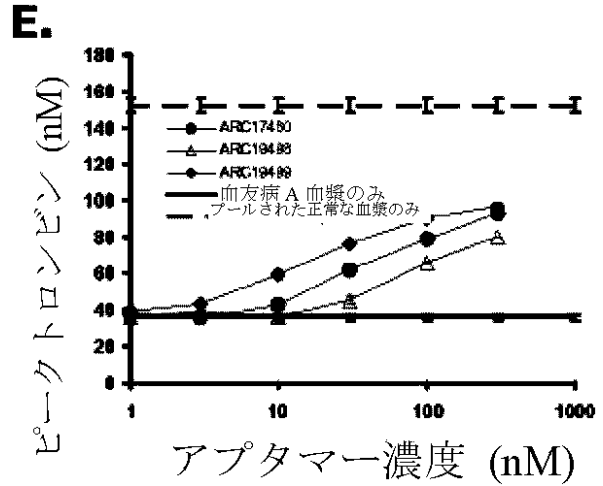
【図 4 0 C】



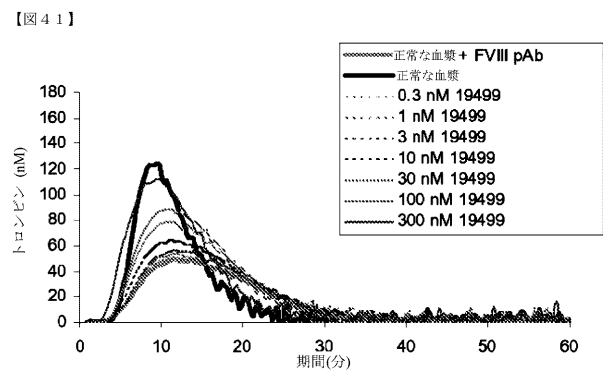
【図 40 D】



【図 40 E】

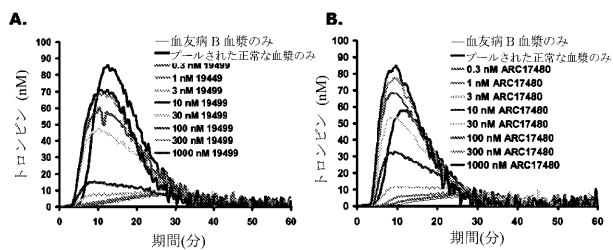


【図 41】



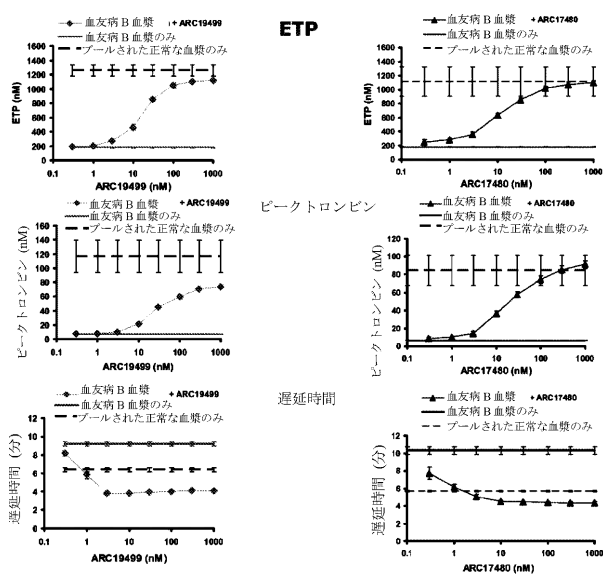
【図 42】

【図 42】

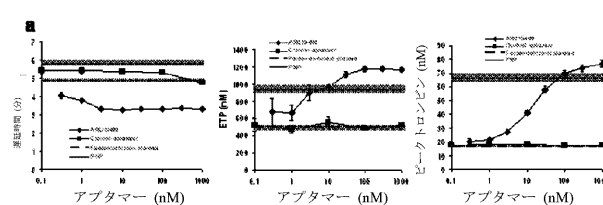


【図 43】

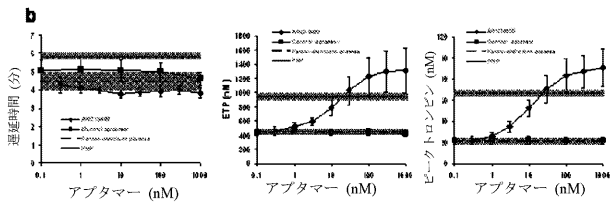
【図 43】



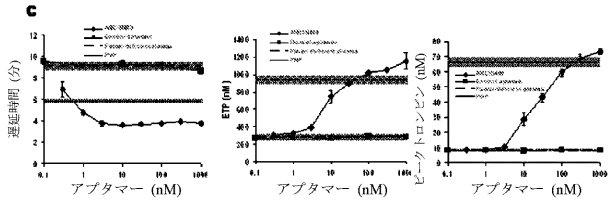
【図 44 A】



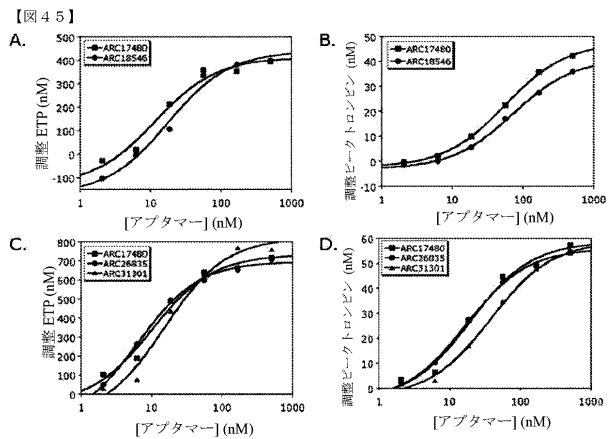
【図 4 4 B】



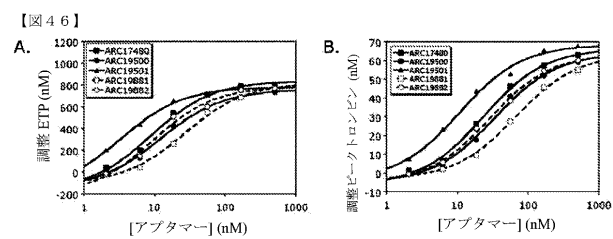
【図 4 4 C】



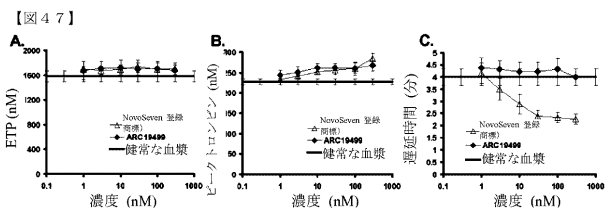
【図 4 5】



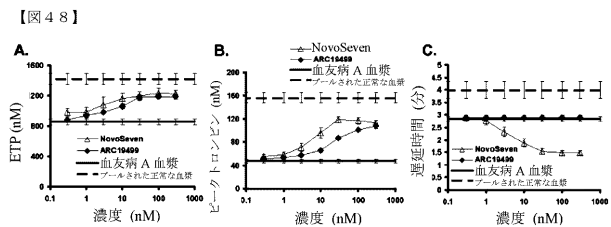
【図 4 6】



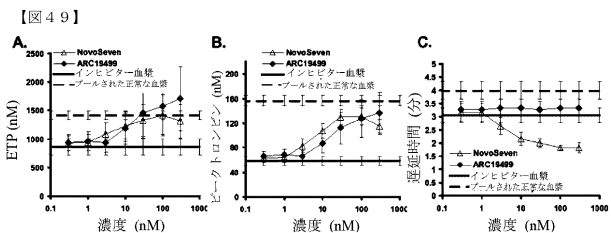
【図 4 7】



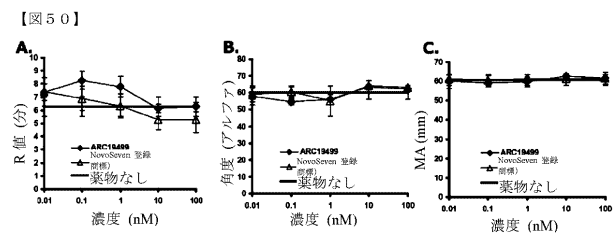
【図 4 8】



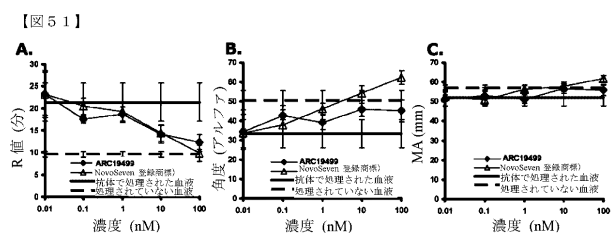
【図 4 9】



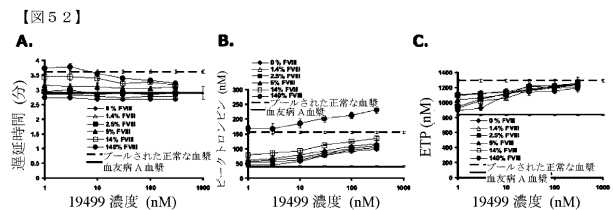
【図 5 0】



【図 5 1】

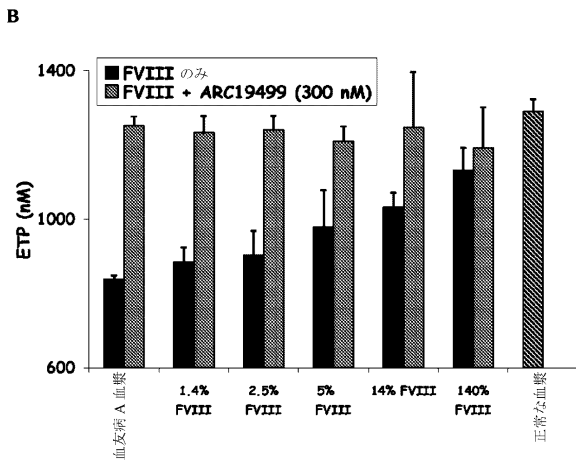
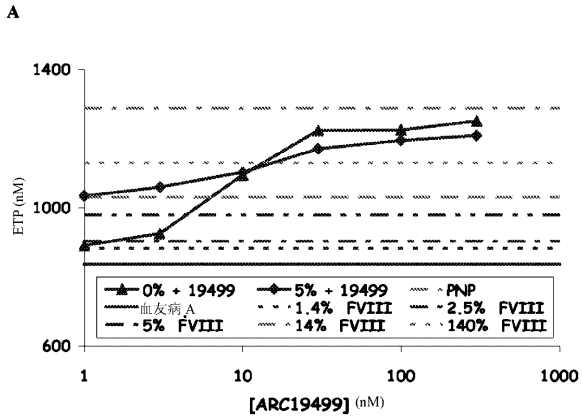


【図 5 2】



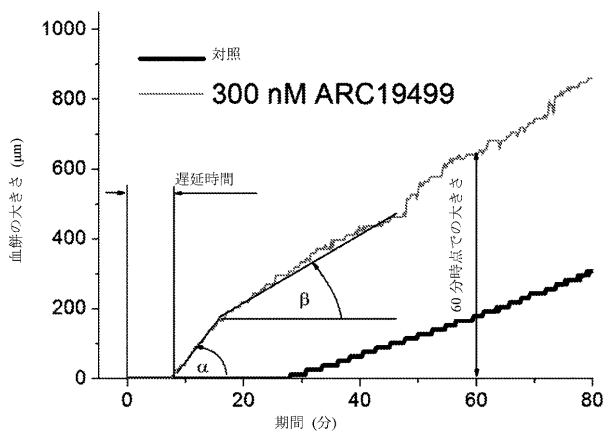
【図 5 3】

【図 5 3】



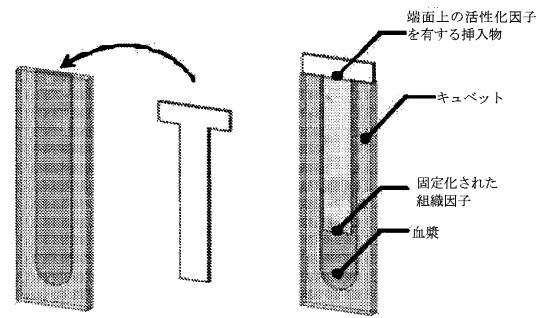
【図 5 6】

【図 5 6】



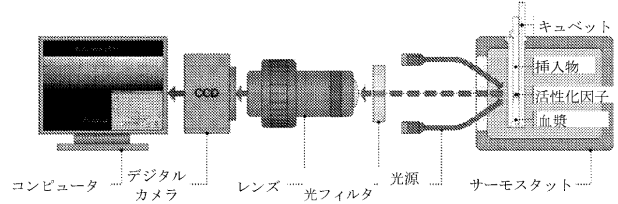
【図 5 4 A】

A



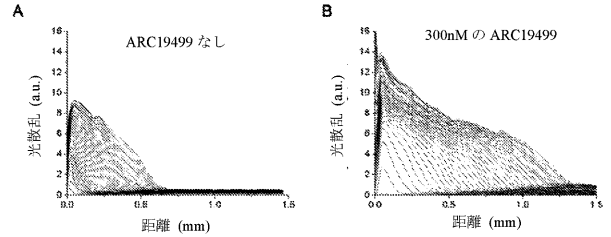
【図 5 4 B】

B



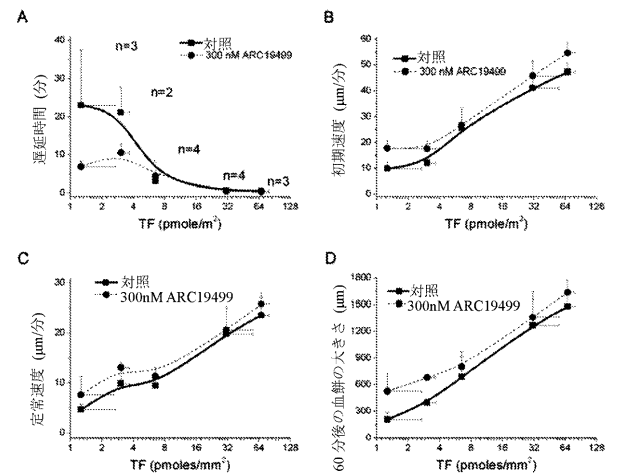
【図 5 5】

【図 5 5】



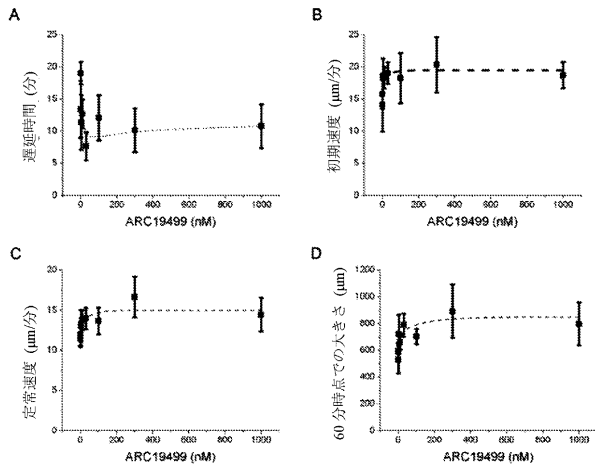
【図 5 7】

【図 5 7】



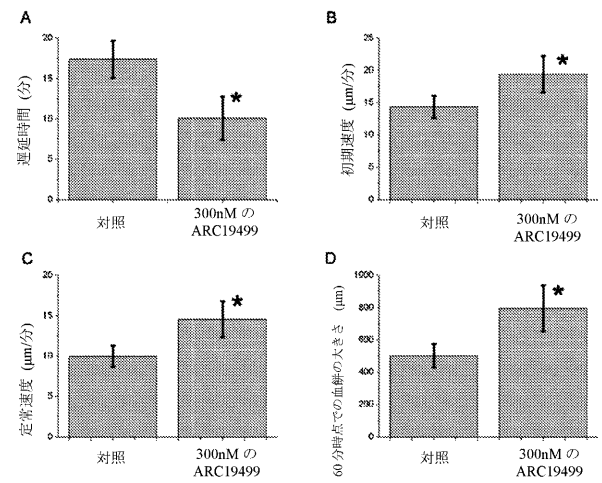
【図 58】

【図 58】



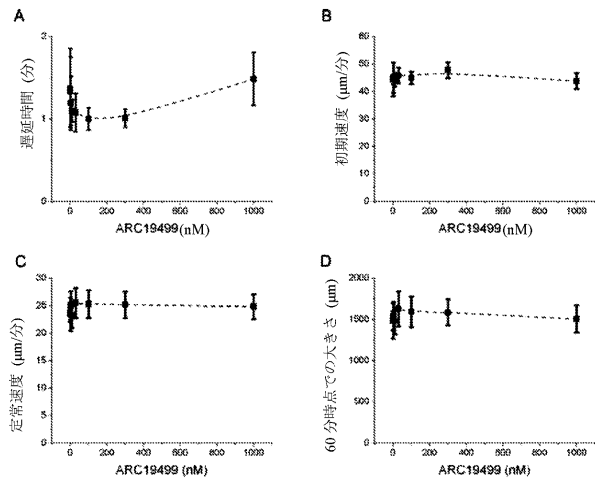
【図 59】

【図 59】



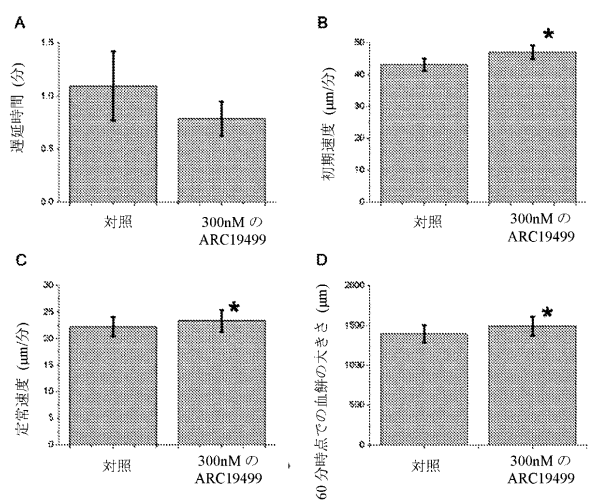
【図 60】

【図 60】



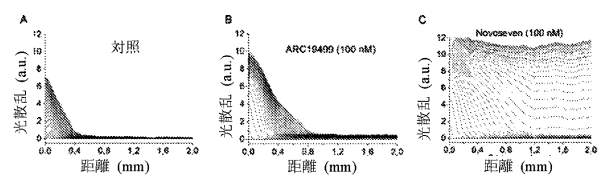
【図 61】

【図 61】



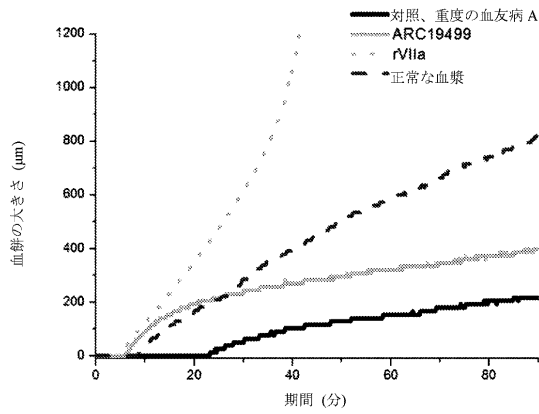
【図 62】

【図 62】



【図 6 4】

【図 6 4】



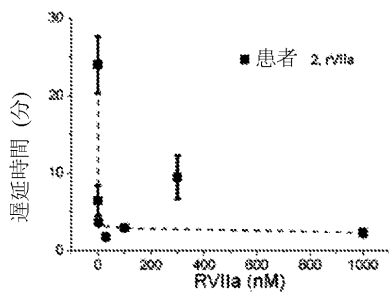
【図 6 5】

【図 6 5】

患者番号	年齢	毎月の出血イベント	実験日の 第 VIII 因子レベル、%	APTT、秒
1	21	0-1	<1	103
2	24	1-2	2.1	82
3	43	1-2	1.2	86
4	48	1-2	1.4	80
5	21	1-2	<1	120
6	36	2-3	<1	102
7	19	3-5	2.8	99
8	30	0-1	<1	124

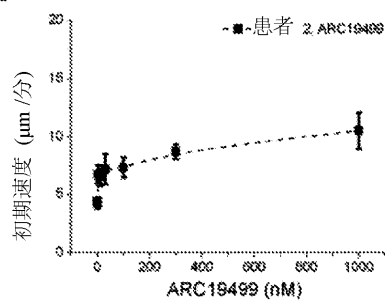
【図 6 7 B】

B



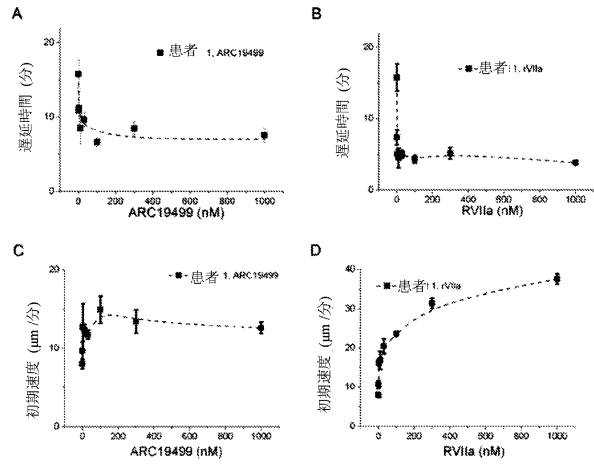
【図 6 7 C】

C



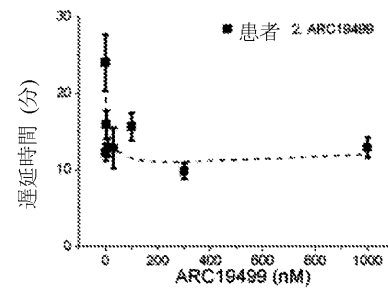
【図 6 6】

【図 6 6】



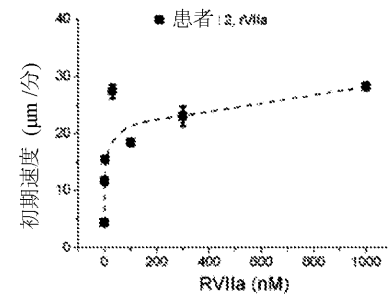
【図 6 7 A】

A



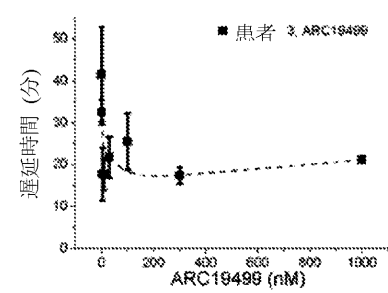
【図 6 7 D】

D

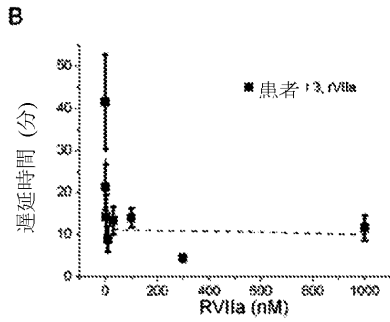


【図 6 8 A】

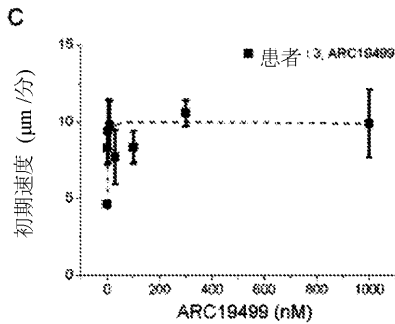
A



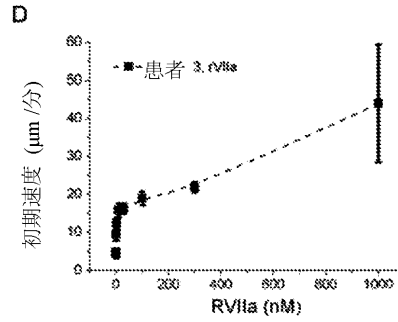
【図 6 8 B】



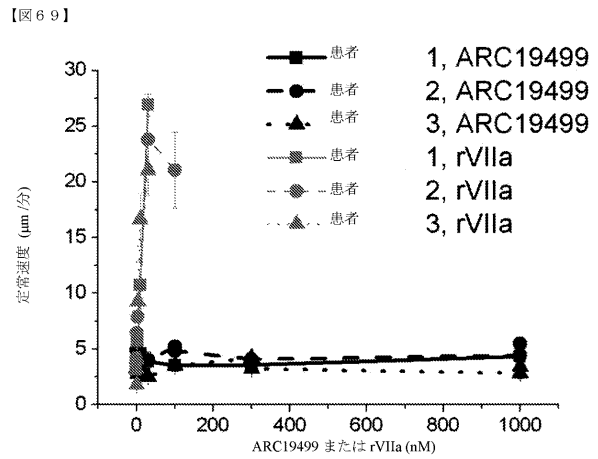
【図 6 8 C】



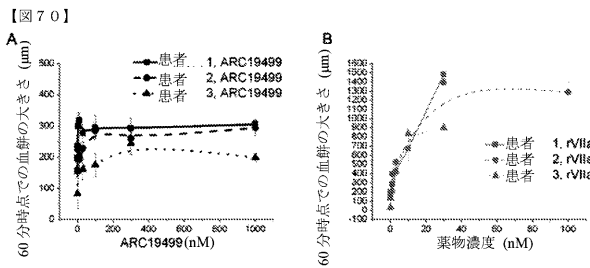
【図 6 8 D】



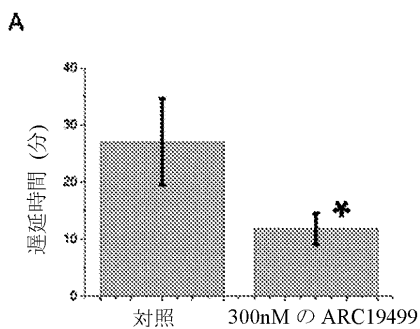
【図 6 9】



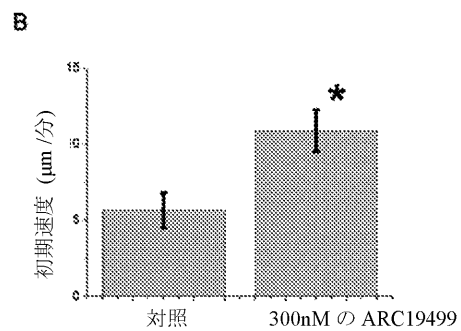
【図 7 0】



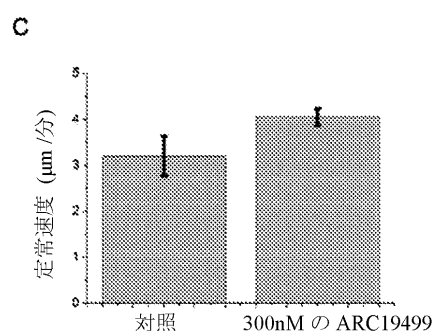
【図 7 1 A】



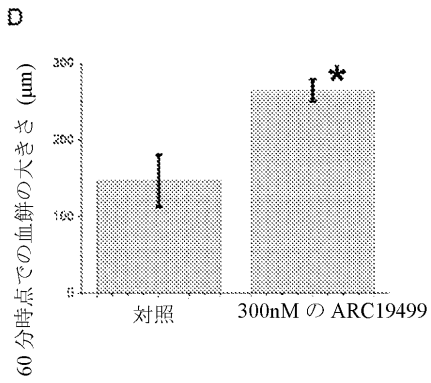
【図 7 1 B】



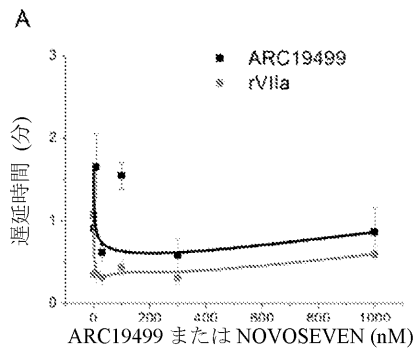
【図 7 1 C】



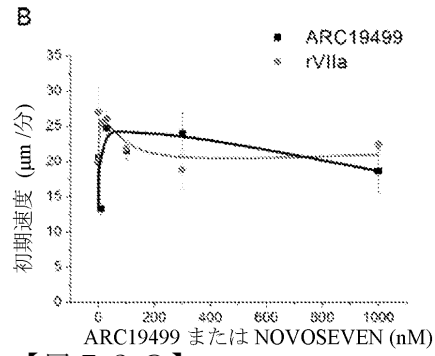
【図 7 1 D】



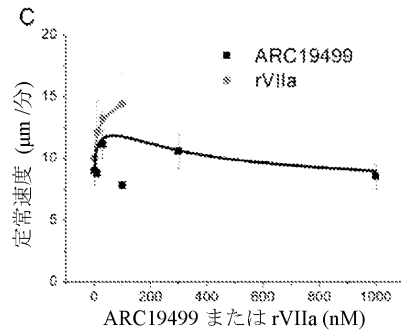
【図 7 2 A】



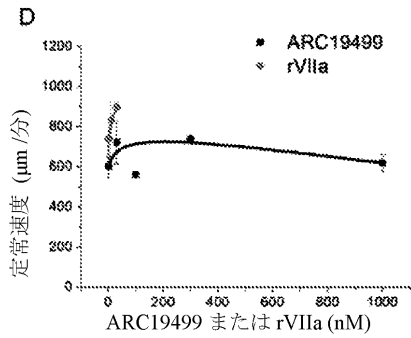
【図 7 2 B】



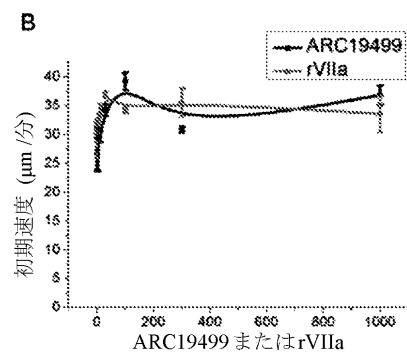
【図 7 2 C】



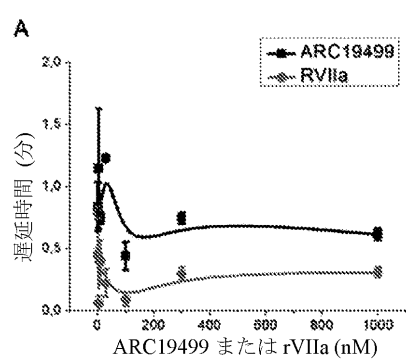
【図 7 2 D】



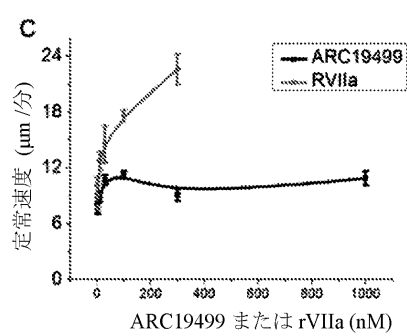
【図 7 3 B】



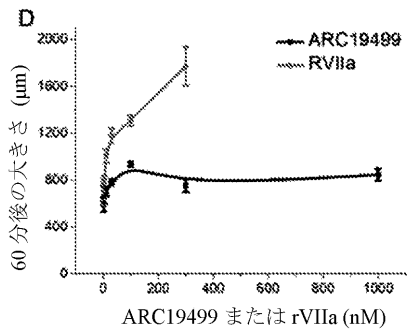
【図 7 3 A】



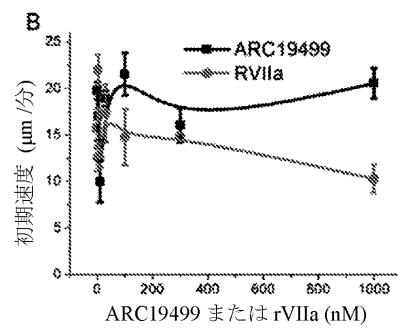
【図 7 3 C】



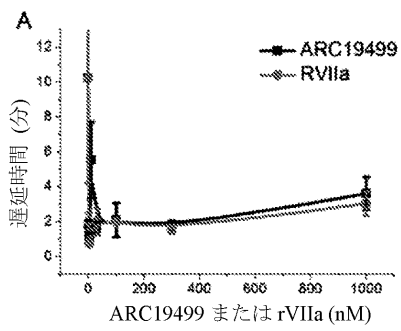
【図 7 3 D】



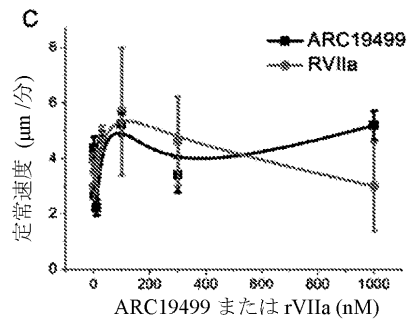
【図 7 4 B】



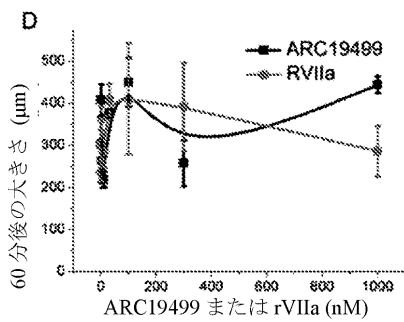
【図 7 4 A】



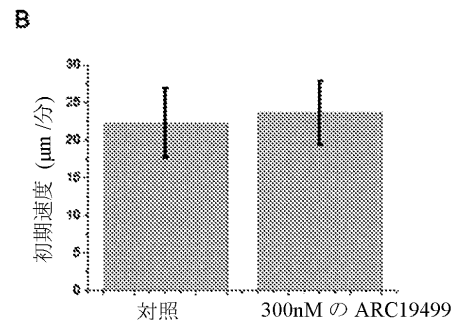
【図 7 4 C】



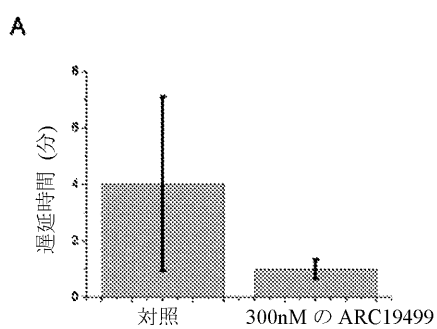
【図 7 4 D】



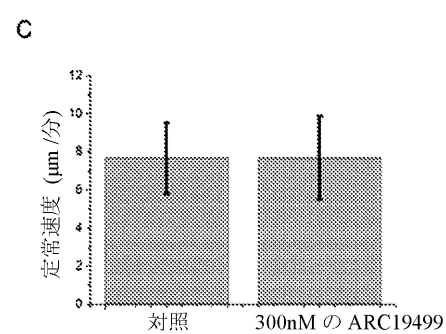
【図 7 5 B】



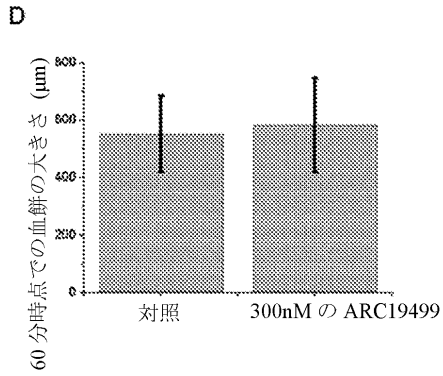
【図 7 5 A】



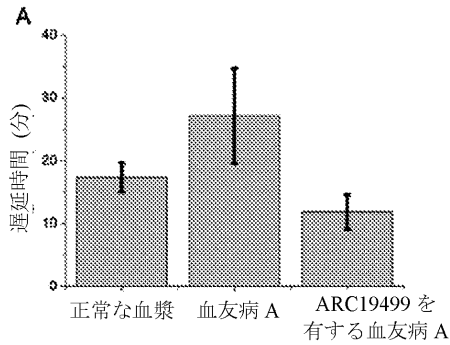
【図 7 5 C】



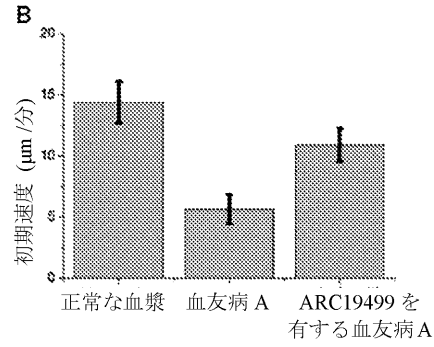
【図 7 5 D】



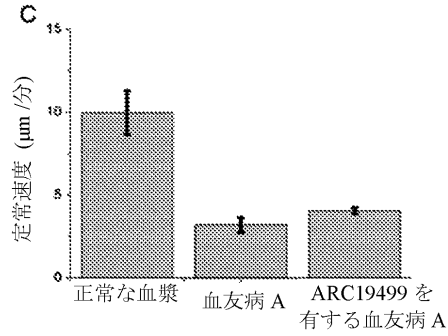
【図 7 6 A】



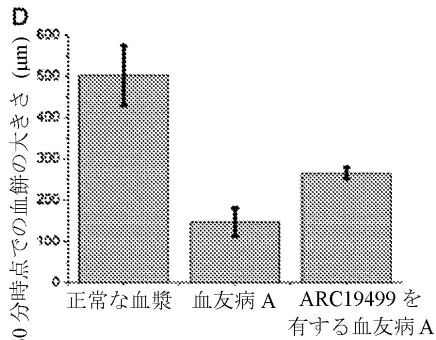
【図 7 6 B】



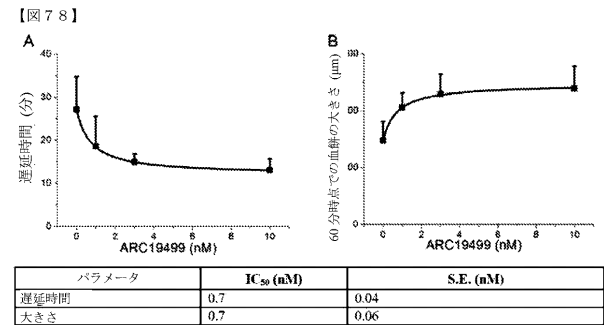
【図 7 6 C】



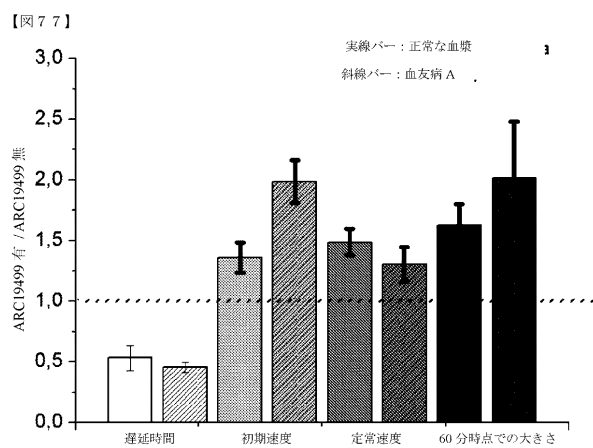
【図 7 6 D】



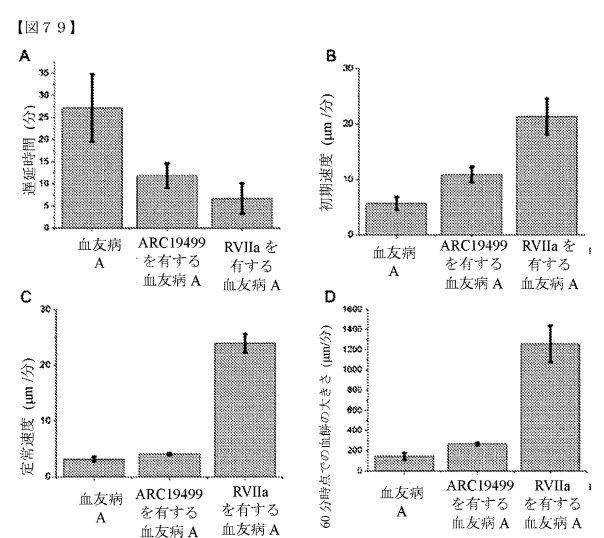
【図 7 8】



【図 7 7】

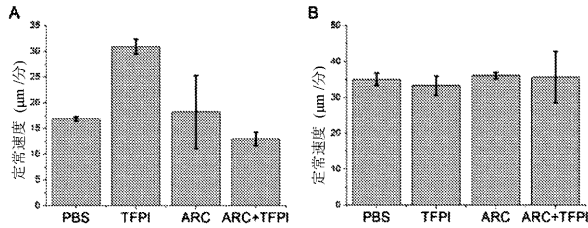


【図 7 9】



【図 80】

【図 80】



【図 81】

【図 81】

正常な対象由来の全血の TF-ACT			
[ARC19499] (nM)	#2 (N) (秒)	#6 (N) (秒)	#7 (N) (秒)
700		311	
350	317	287	277
175	278	295	293
88	319	305	258
44			267
0	353	342	311

血友病 B 対象由来の全血の TF-ACT		
[ARC19499] (nM)	#4 (B) (秒)	#9 (B) (秒)
350	438	522
175	435	457/510
88	323	420
44	460	510
0	528	580

血友病 A 対象由来の全血の TF-ACT							
[ARC19499] (nM)	#1 (A) (秒)	#3 (A) (秒)	#5 (A) (秒)	#8 (A) (秒)	#10 (A) (秒)	#11 (A) (秒)	#12 (A) (秒)
3115	264						
1558	313						
1400						455	299
800	256						
700		551/500	489		416	634	281
350		444	434	483	418	347	295
175		457	392	453	456	491	291
88			468	464		456	306
44					477		
0	578	651	540	642	527	783	328

【図 82】

【図 82】

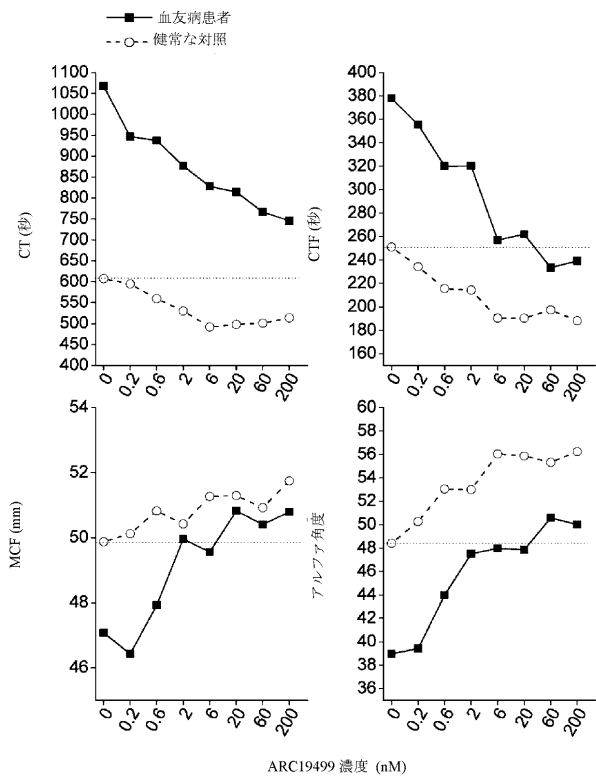
正常な対象由来の血漿の希釈 PT			
[ARC19499] (nM)	#2 (N) (秒)	#6 (N) (秒)	#7 (N) (秒)
500	179	185	174
125	183	225	168
32	181	242	170
8	191	246	176
2	294	274	265
0	>360	>360	>360

血友病 B 対象由来の血漿の希釈 PT		
[ARC19499] (nM)	#4 (B) (秒)	#9 (B) (秒)
500	215	185
125	227	189
32	225	192
8	241	210
2	>360	>360
0	>360	>360

血友病 A 対象由来の血漿の希釈 PT							
[ARC19499] (nM)	#1 (A) (秒)	#3 (A) (秒)	#5 (A) (秒)	#8 (A) (秒)	#10 (A) (秒)	#11 (A) (秒)	#12 (A) (秒)
500	163	162	162	156	154	162	>360
125	167	164	163	157	156	168	>360
32	171	168	164	163	157	171	>360
8	185	193	175	192	163	195	>360
2	>360	>360	>360	>360	169	>360	>360
0	>360	>360	>360	>360	169	>360	>360

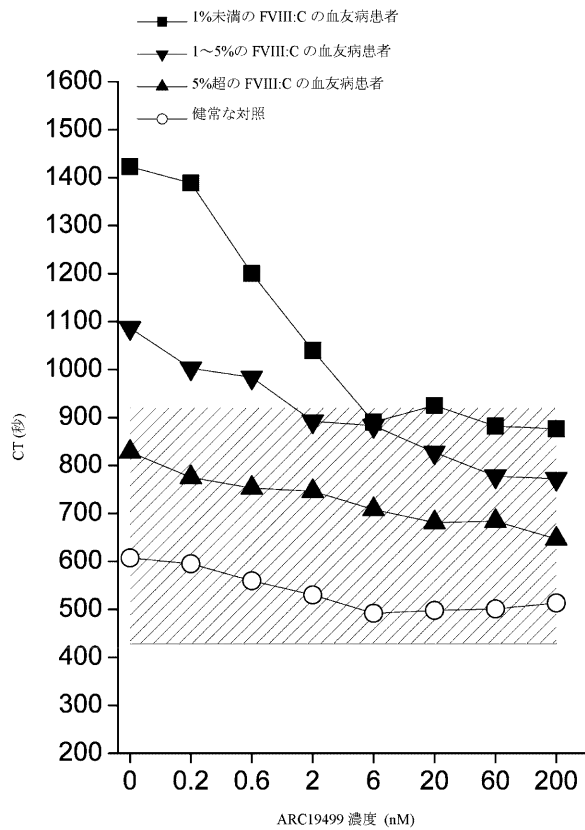
【図 83】

【図 83】



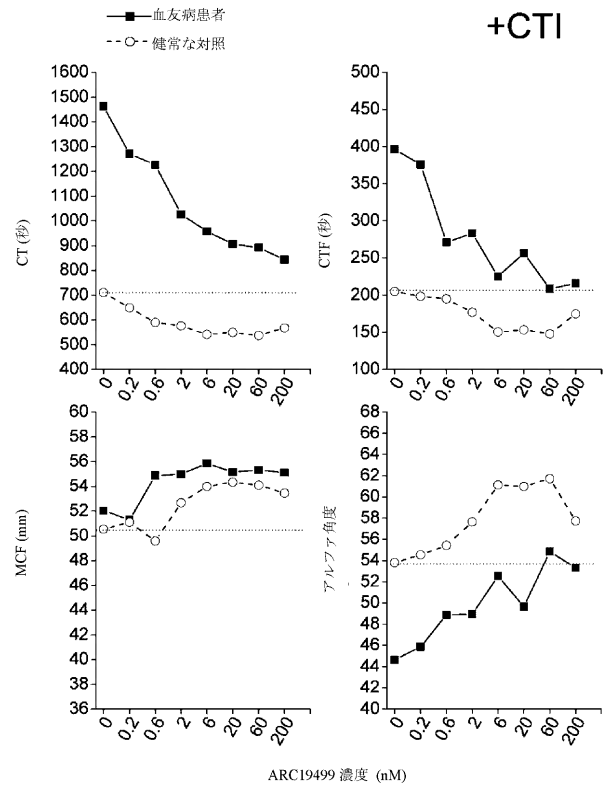
【図 8 4】

【図 8 4】



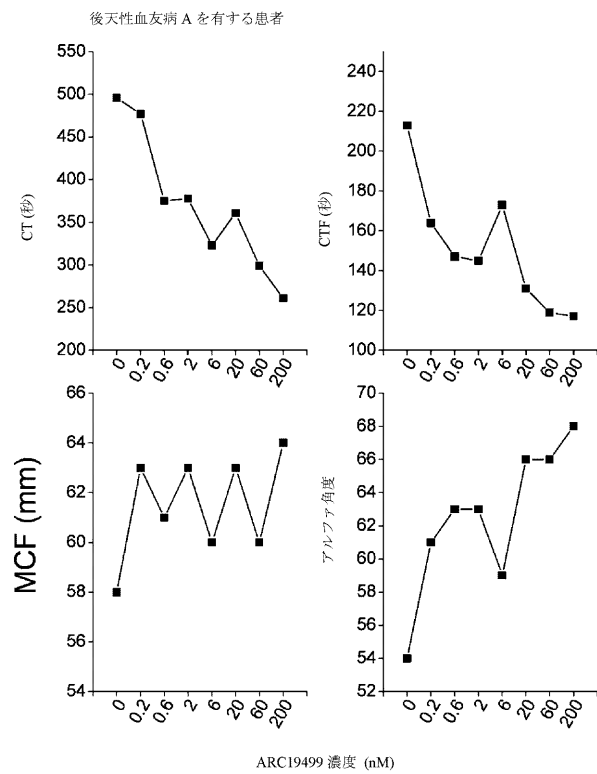
【図 8 5】

【図 8 5】



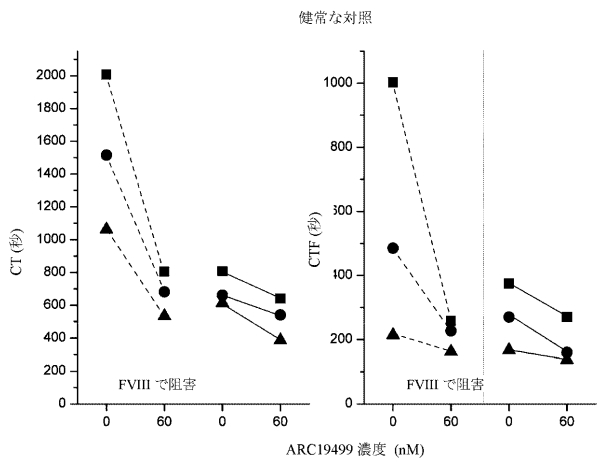
【図 8 6】

【図 8 6】



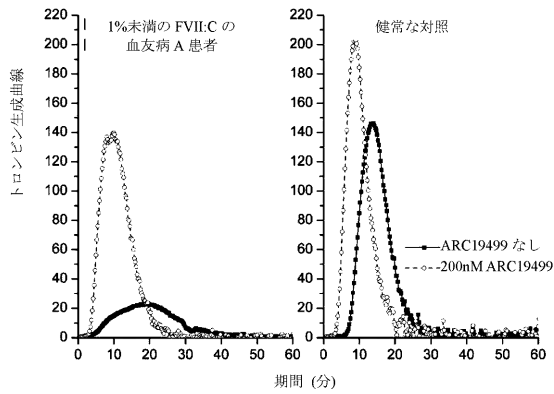
【図 8 7】

【図 8 7】



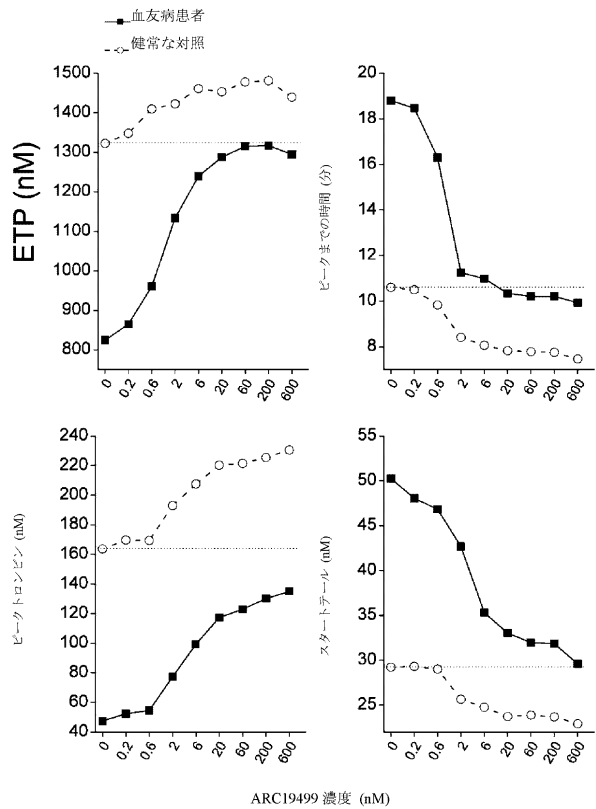
【図 88】

【図 88】



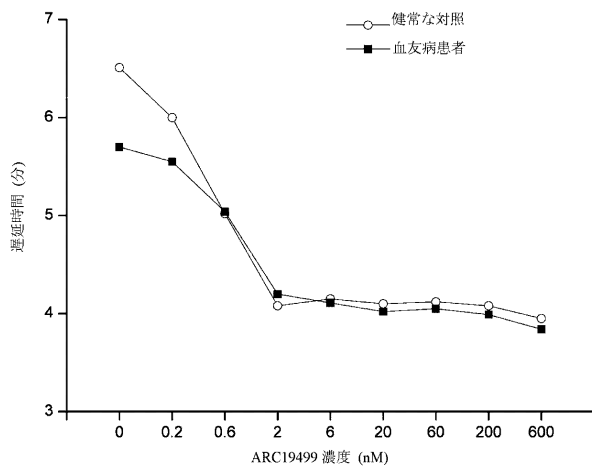
【図 89】

【図 89】



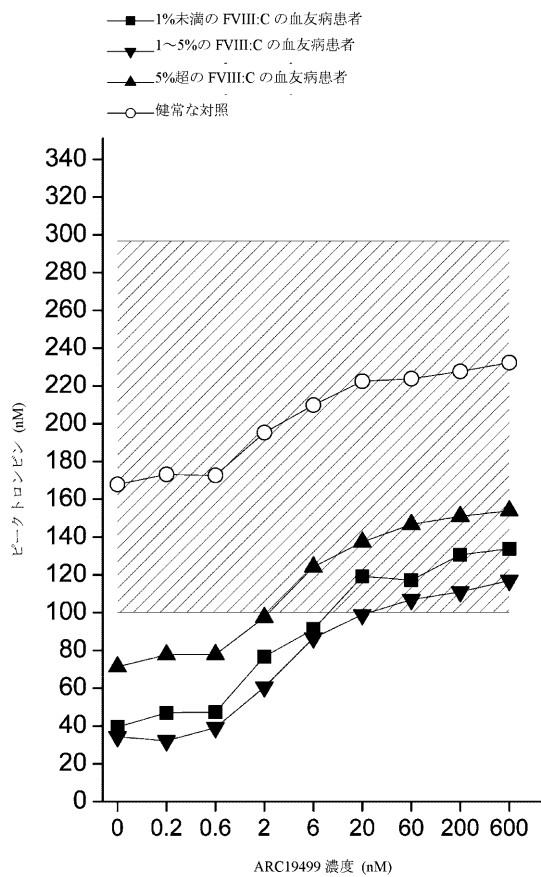
【図 90】

【図 90】



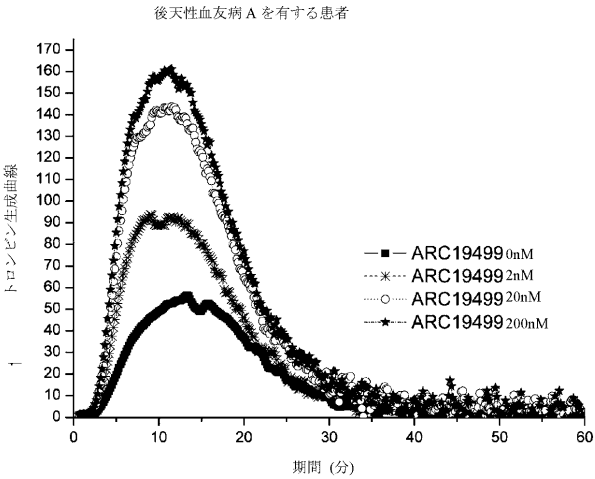
【図 91】

【図 91】



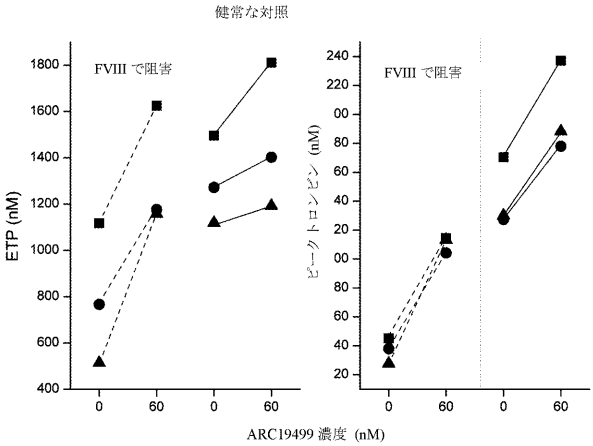
【 図 9 2 】

【 図 9 2 】



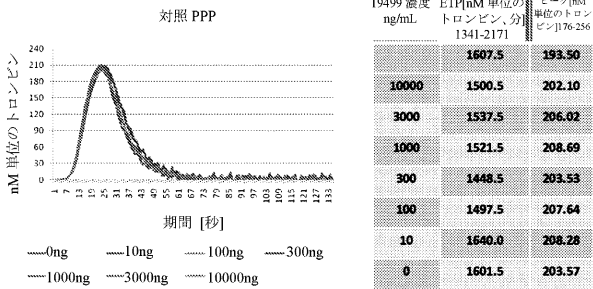
【 図 9 3 】

【 図 9 3 】



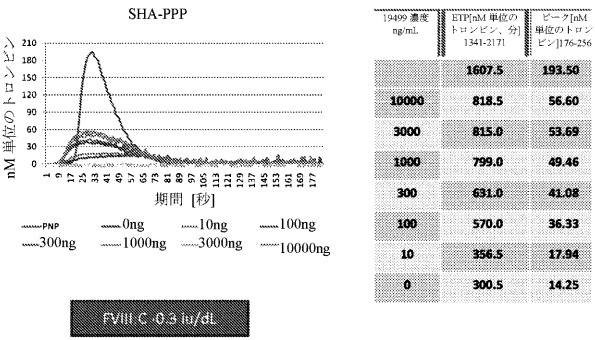
【 図 9 4 】

【 図 9 4 】



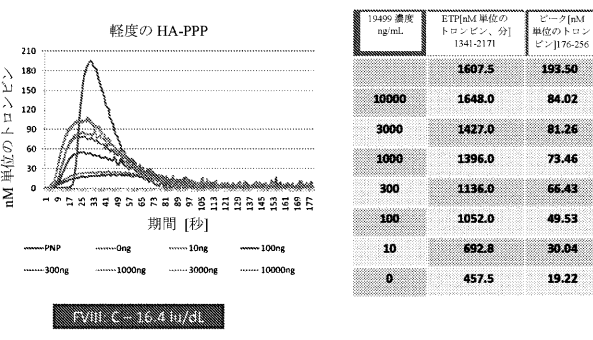
【 図 9 5 】

【 図 9 5 】



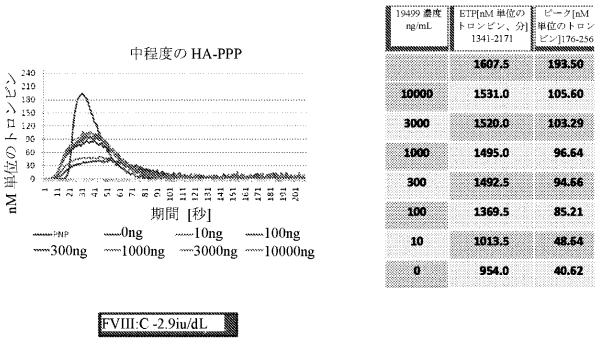
【 図 9 7 】

【 図 9 7 】

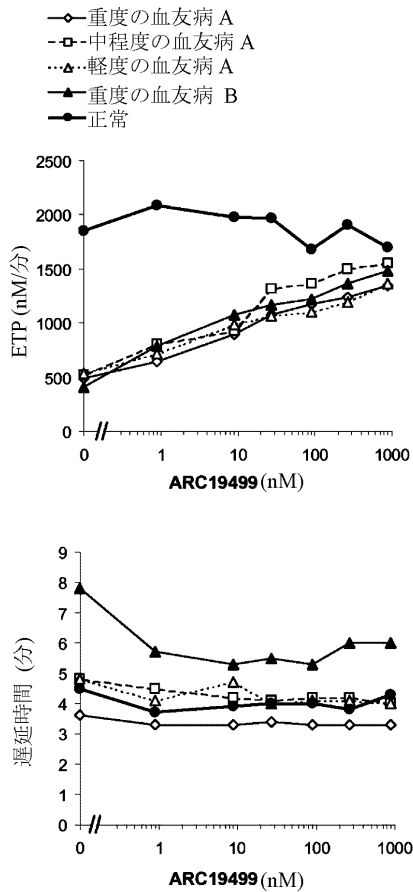


【 図 9 6 】

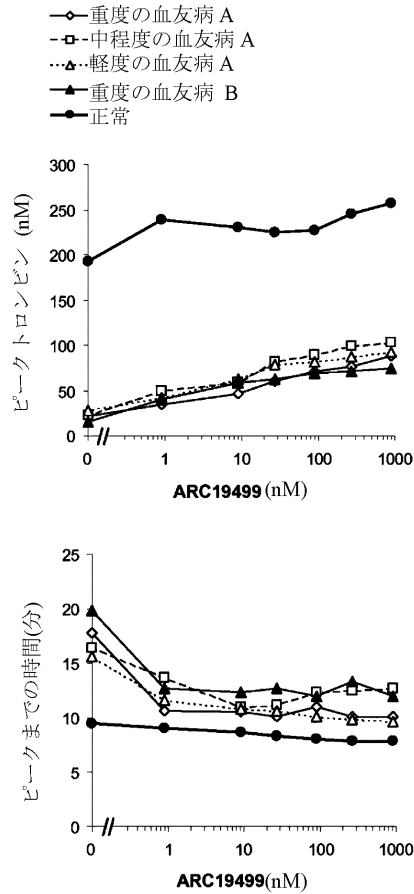
【 図 9 6 】



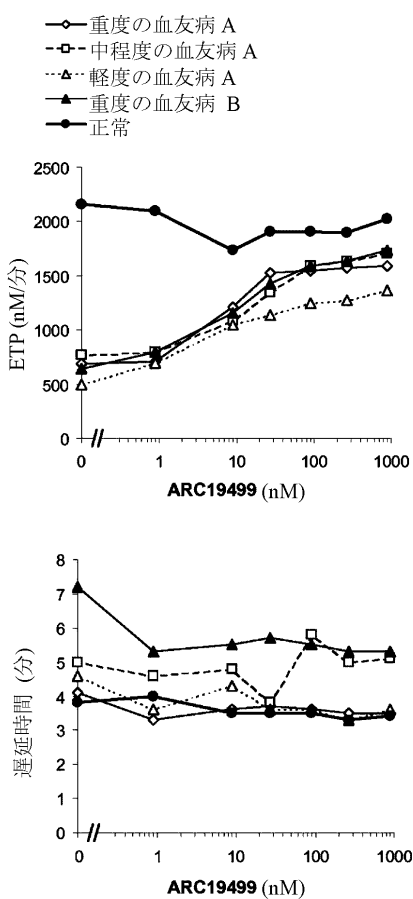
【図 9 8 - 1】



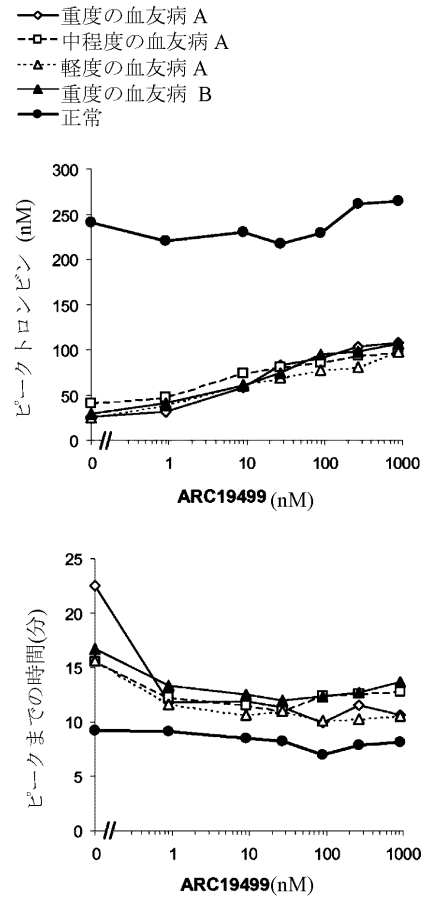
【図 9 8 - 2】



【図 9 9 - 1】



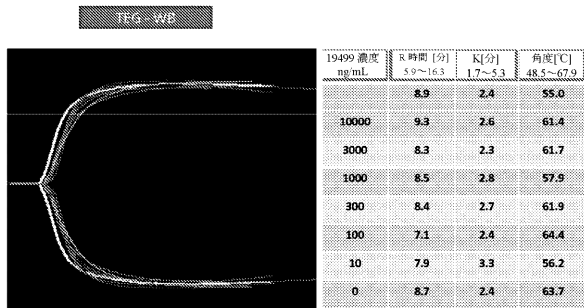
【図 9 9 - 2】



【図100】

【図100】

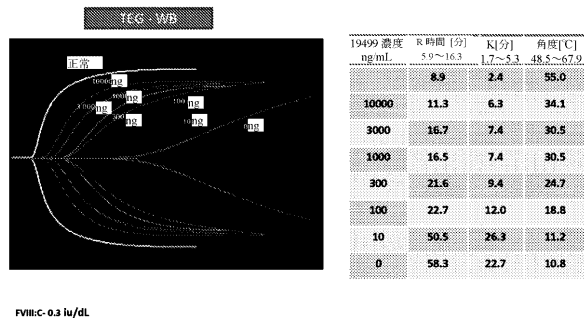
ARC HV 01



【図101】

【図101】

ARC SHA 02

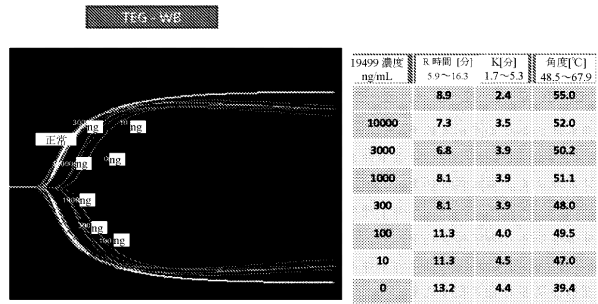


FVIII:C = 0.3 IU/dL

【図102】

【図102】

ARC MoHA 01

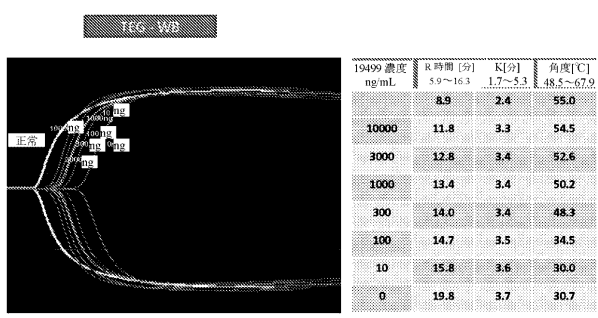


FVIII:C = 2.9 IU/dL

【図103】

【図103】

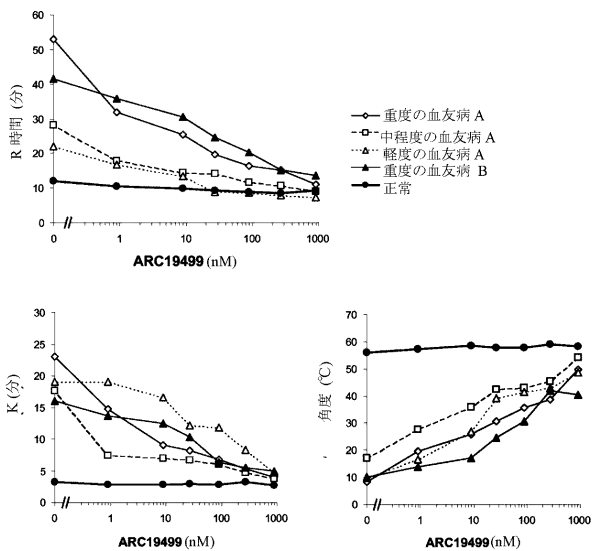
ARC MiHA 01



FVIII:C = 8.8 IU/dL

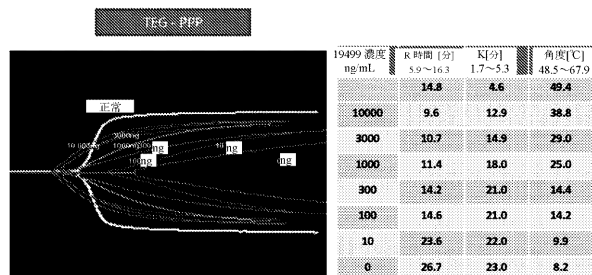
【図104】

【図104】



【図105】

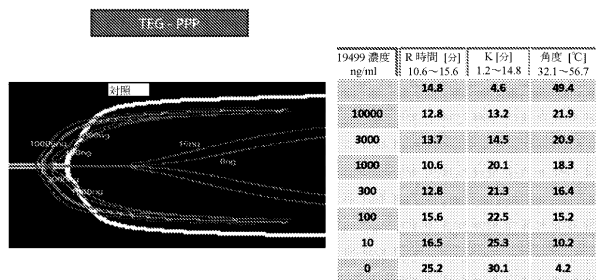
【図105】



【図106】

【図106】

ARC MoHA 01

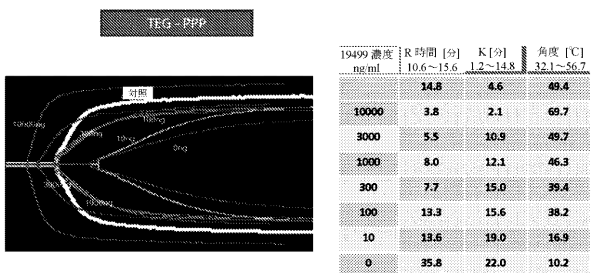


FVIII:C = 2.9

【図107】

【図107】

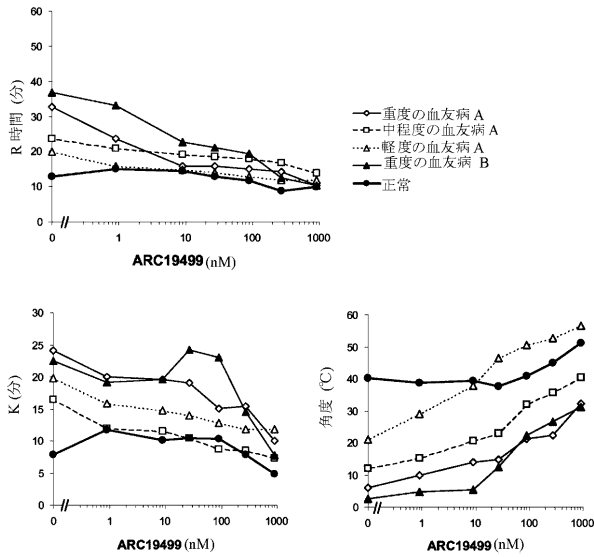
ARC MiHA 03



FVIII:C = 16.4

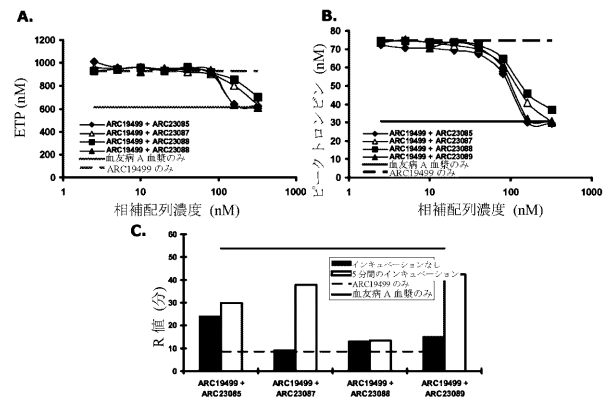
【図 108】

【図 108】



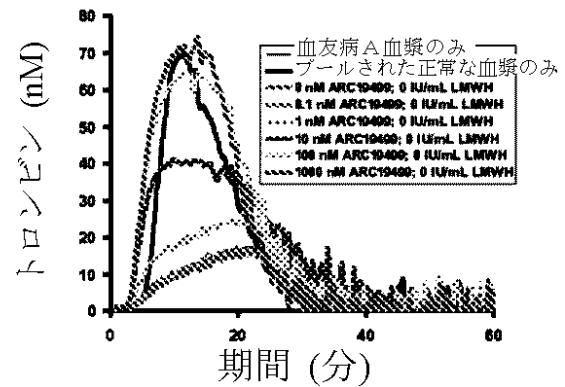
【図 109】

【図 109】



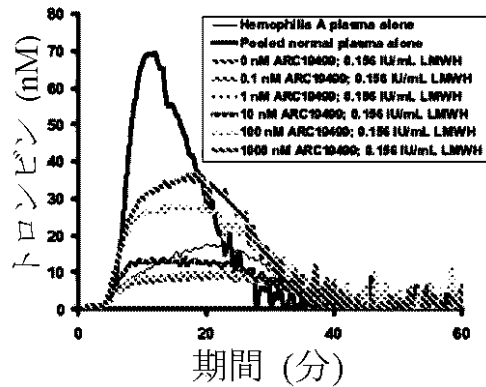
【図 110 A】

A.



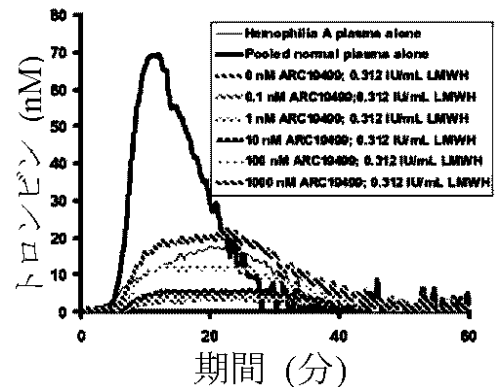
【図 110 B】

B.



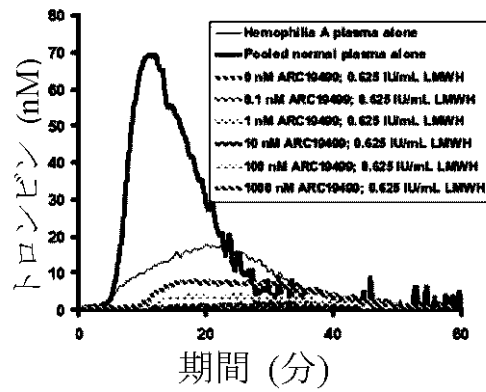
【図 110 C】

C.



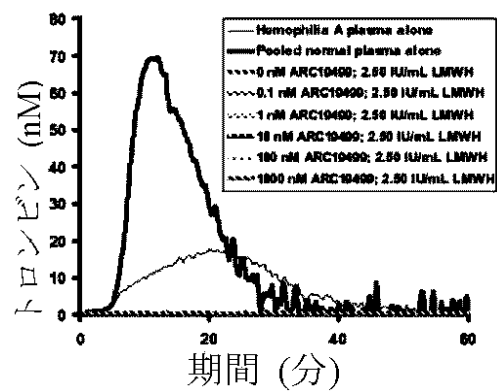
【図 110 D】

D.



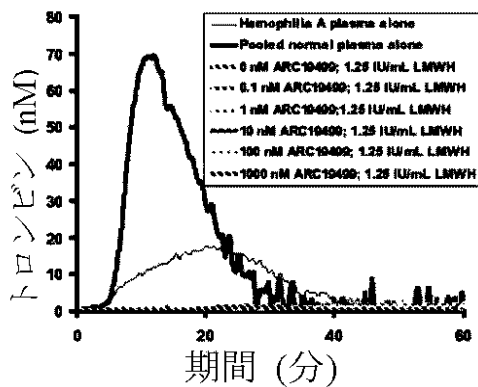
【図 110 F】

F.



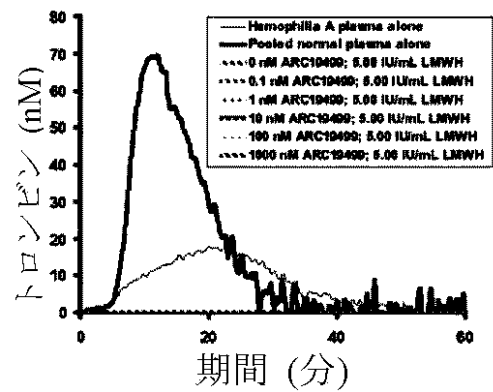
【図 110 E】

E.



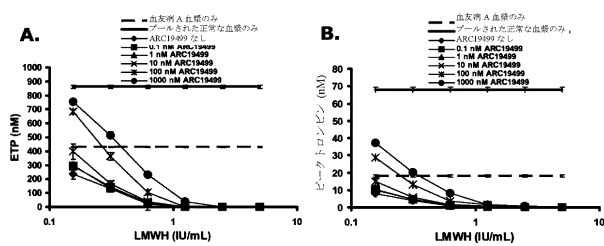
【図 110 G】

G.



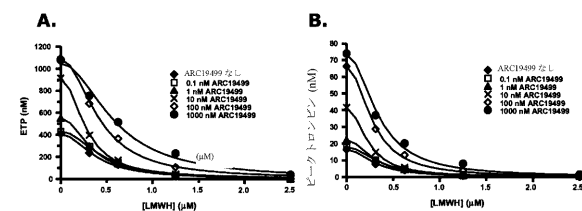
【図 111】

【図 111】



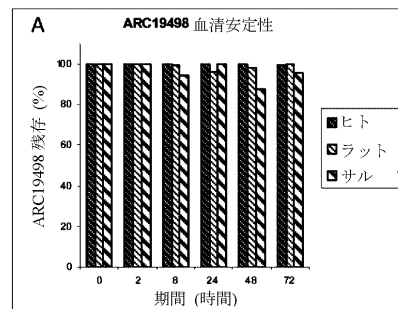
【図 112】

【図 112】

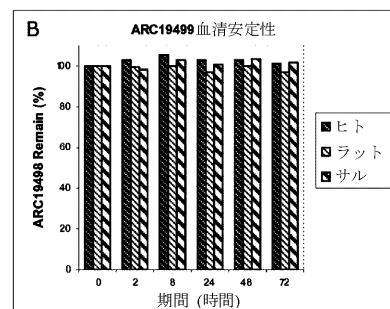


[ARC19499] nM	LMWH IC ₅₀			
	ETP		ピーク thrombin	
	IC ₅₀ (nM)	標準誤差	IC ₅₀ (nM)	標準誤差
0	381	24.3	299	18.0
0.1	449	13.3	353	13.6
1.0	345	9.4	290	8.2
10	274	7.7	226	5.9
100	418	16.5	268	5.9
1000	561	36.2	318	10.6

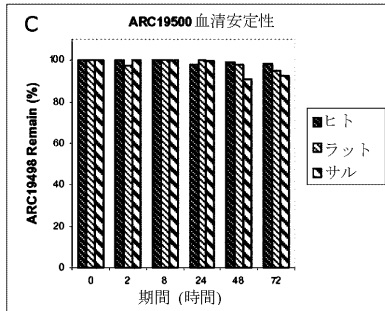
【図 113 A】



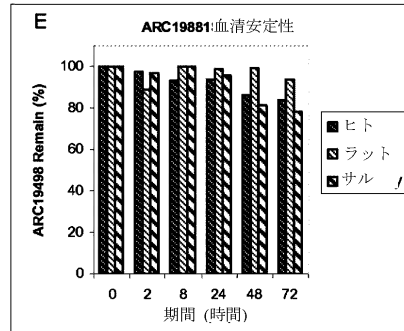
【図 113 B】



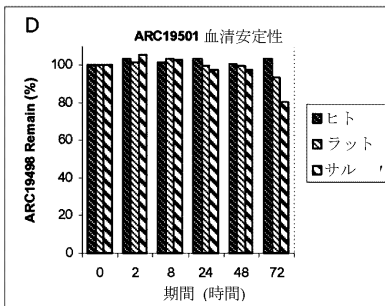
【図 1 1 3 C】



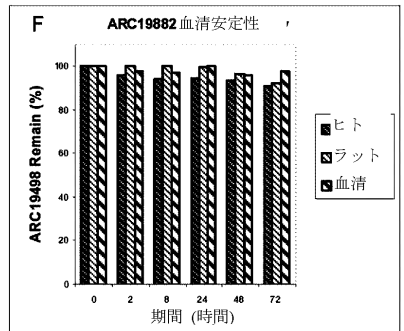
【図 1 1 3 E】



【図 1 1 3 D】

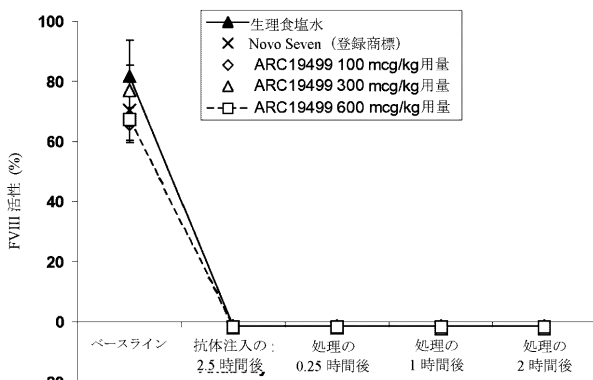


【図 1 1 3 F】



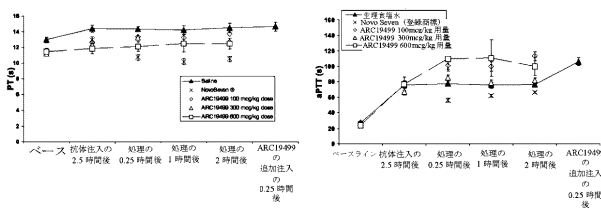
【図 1 1 5】

【図 1 1 5】



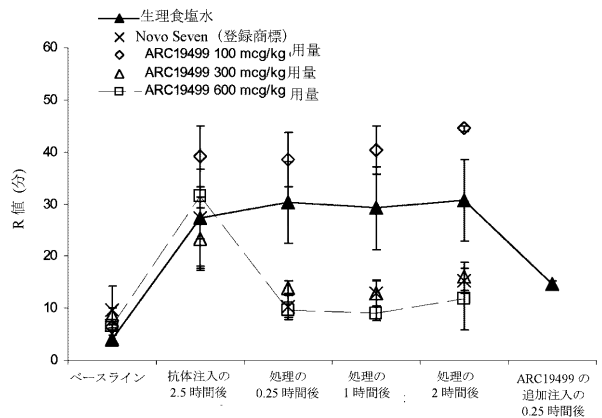
【図 1 1 6】

【図 1 1 6】



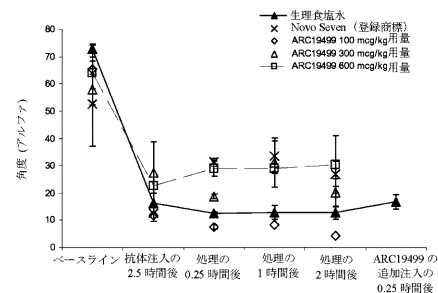
【図 1 1 7 A】

A

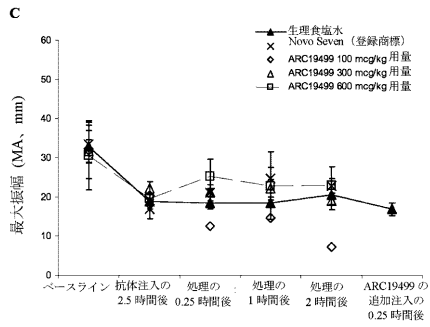


【図 1 1 7 B】

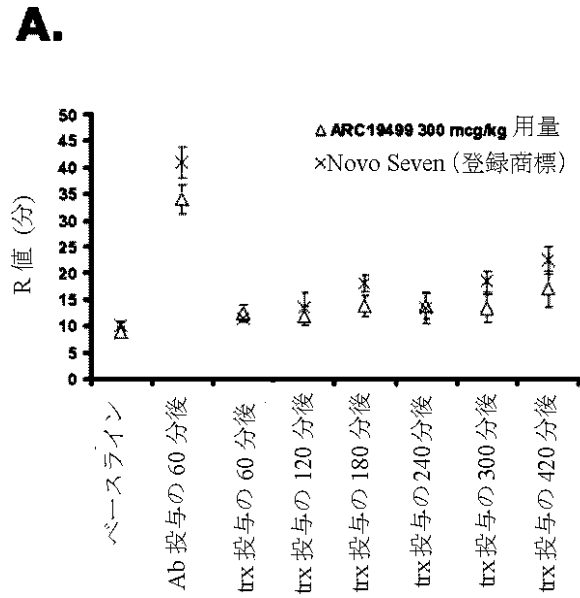
B



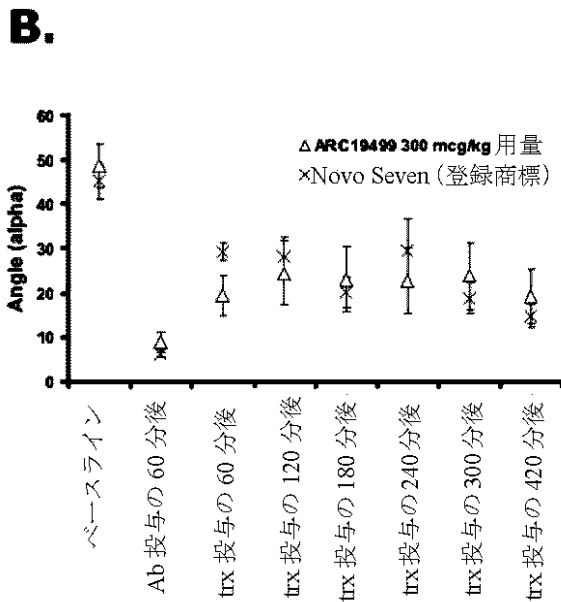
【図 1 1 7 C】



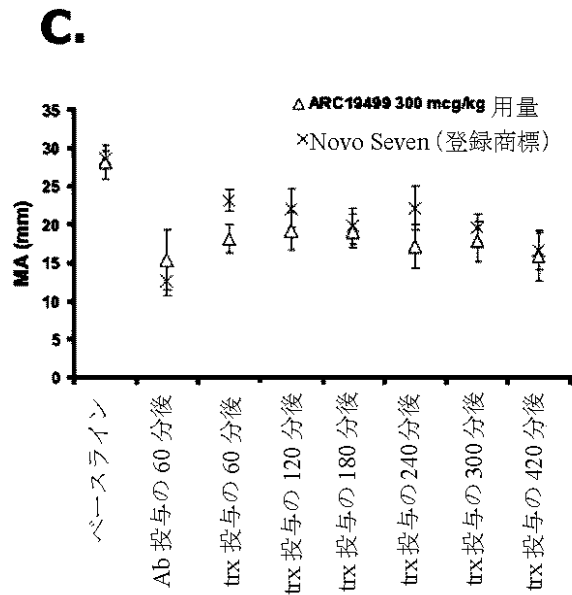
【図 1 1 8 A】



【図 1 1 8 B】

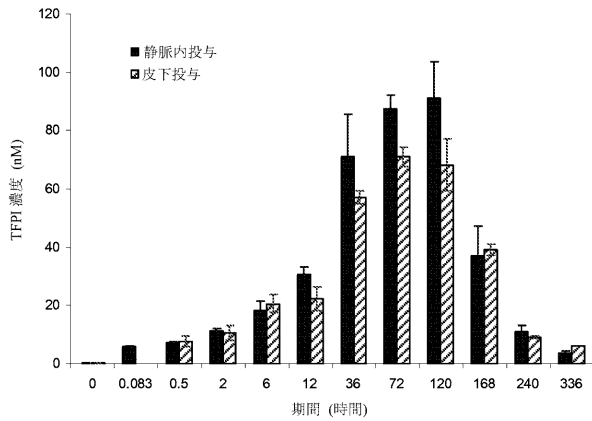


【図 1 1 8 C】



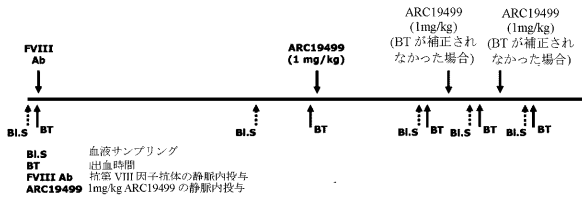
【図 1 1 9】

【図 1 1 9】



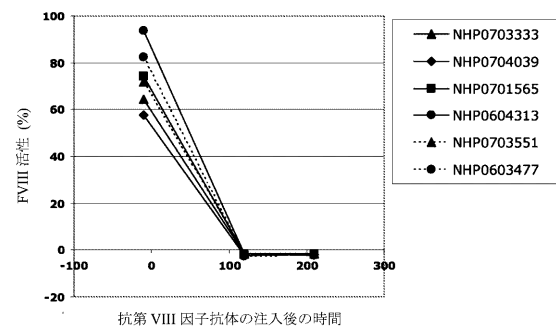
【図 1 2 0】

【図 1 2 0】



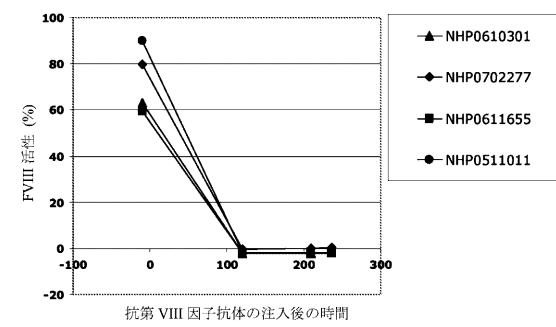
【図 1 2 1 A】

A



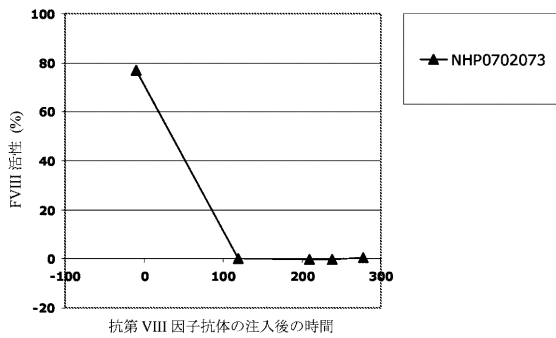
【図 1 2 1 B】

B



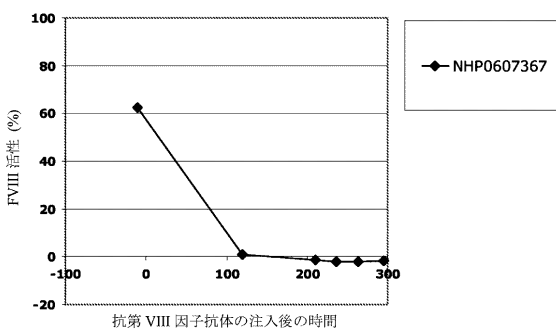
【図 1 2 1 C】

C



【図 1 2 1 D】

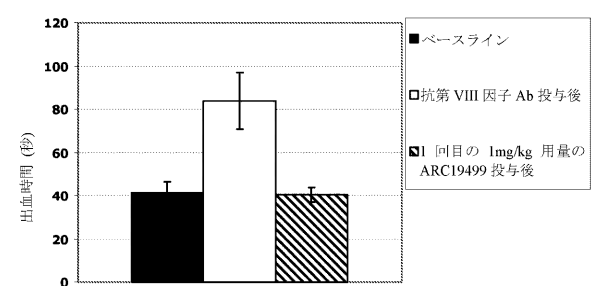
D



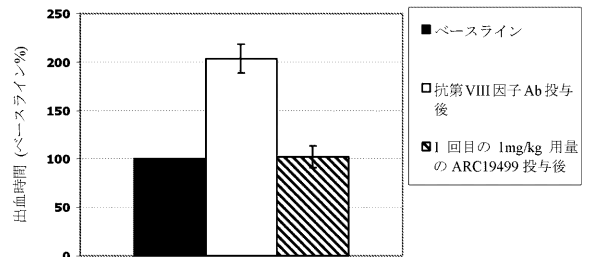
【図 1 2 2】

【図 1 2 2】

A



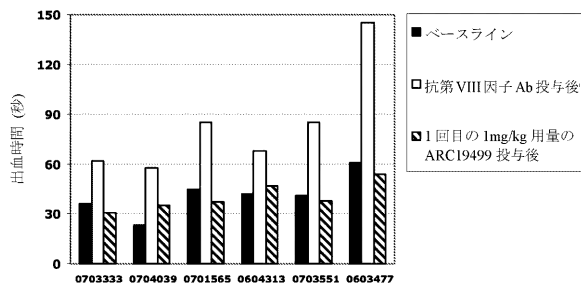
B



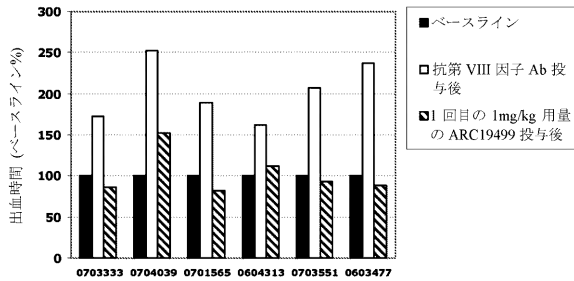
【図 1 2 3】

【図 1 2 3】

A



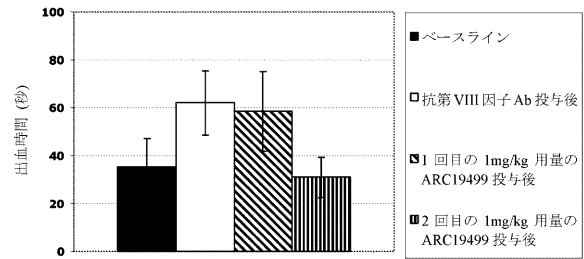
B



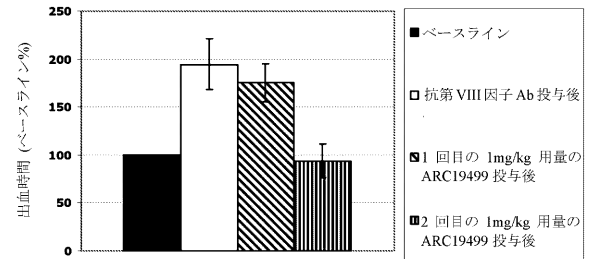
【図 1 2 4】

【図 1 2 4】

A



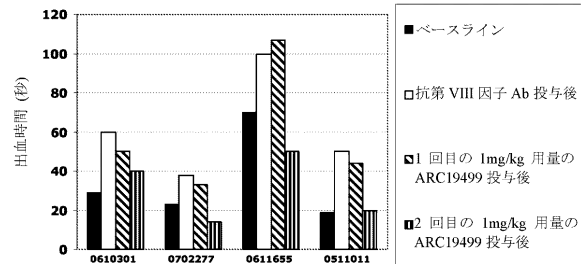
B



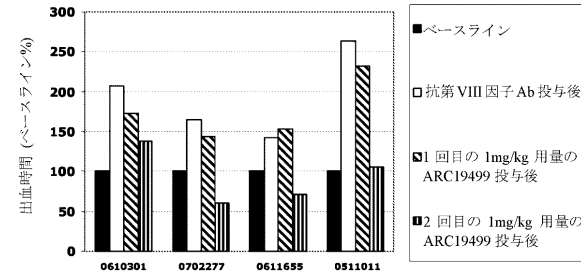
【図 1 2 5】

【図 1 2 5】

A



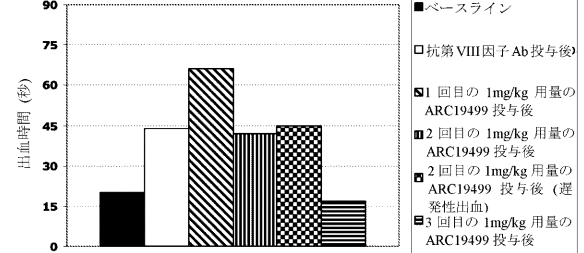
B



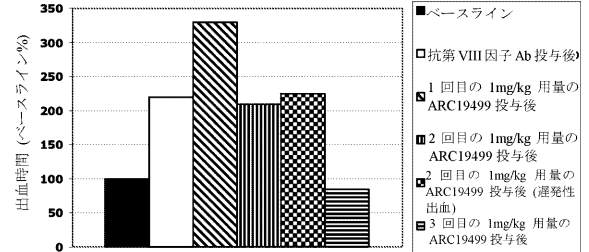
【図 1 2 6】

【図 1 2 6】

A

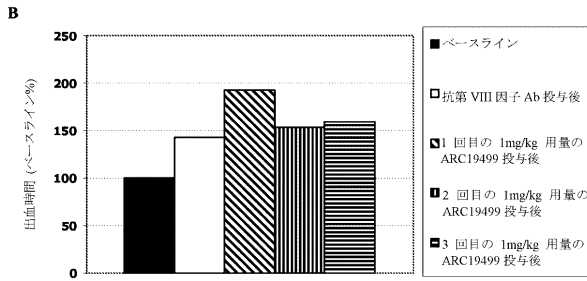
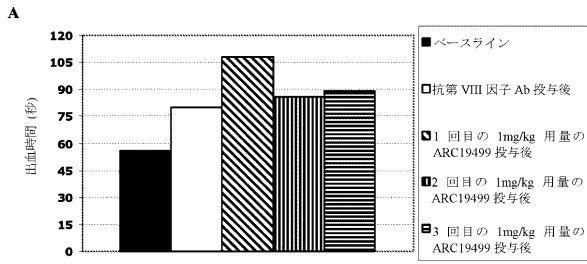


B



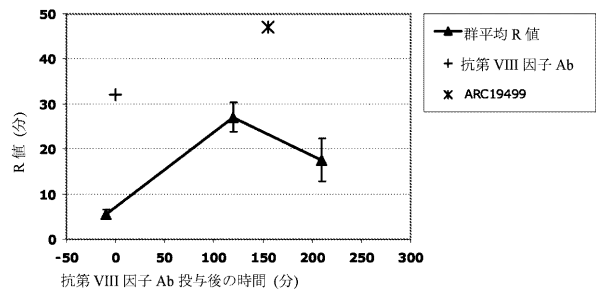
【図 1 2 7】

【図 1 2 7】



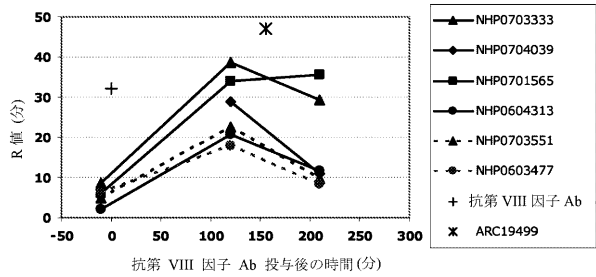
【図 1 2 8】

【図 1 2 8】



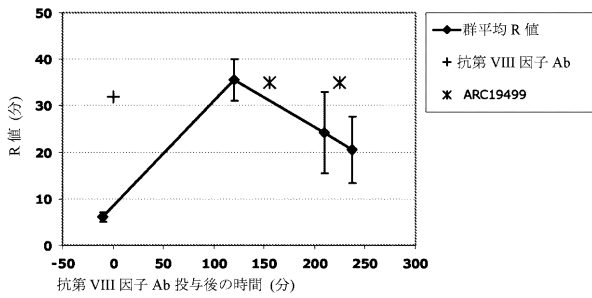
【図 1 2 9】

【図 1 2 9】



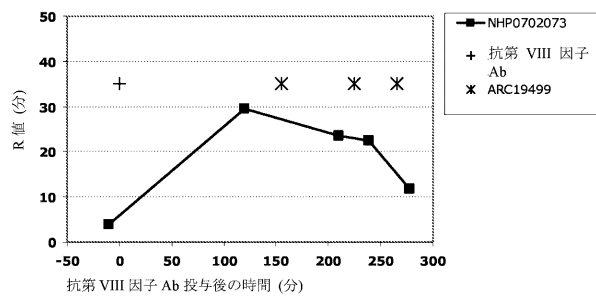
【図 1 3 0】

【図 1 3 0】



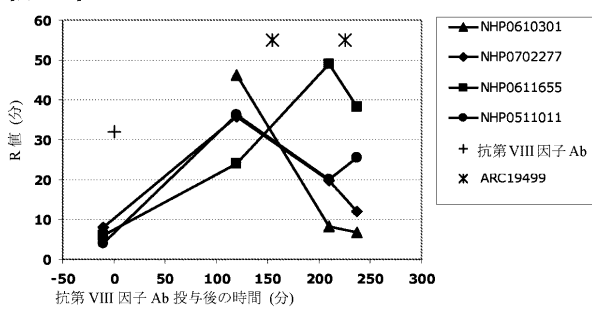
【図 1 3 2】

【図 1 3 2】



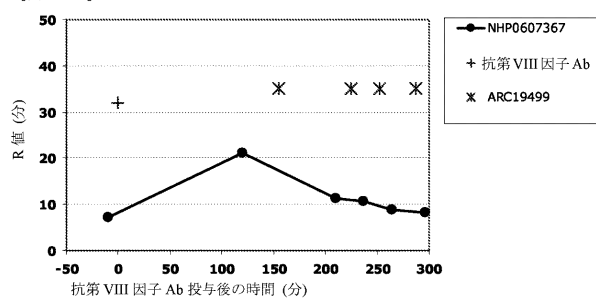
【図 1 3 1】

【図 1 3 1】



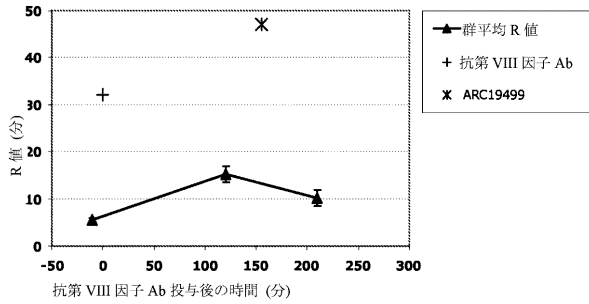
【図 1 3 3】

【図 1 3 3】



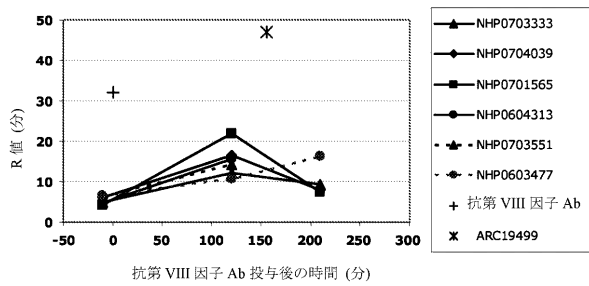
【図 1 3 4】

【図 1 3 4】



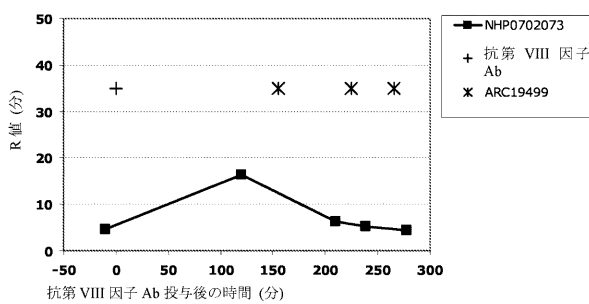
【図 1 3 5】

【図 1 3 5】



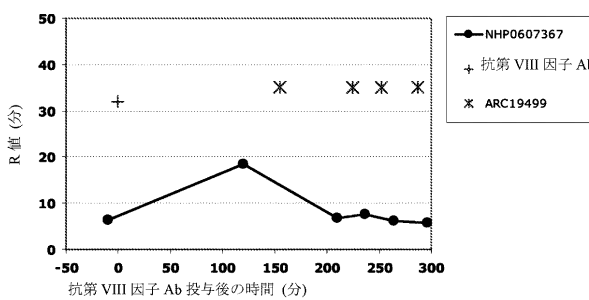
【図 1 3 8】

【図 1 3 8】



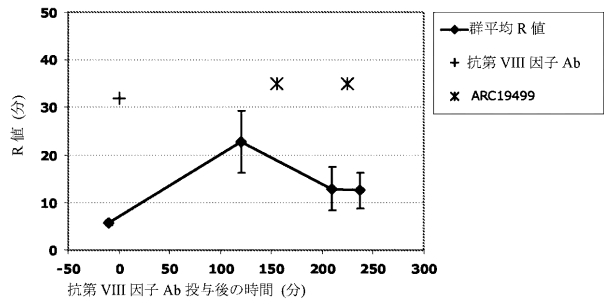
【図 1 3 9】

【図 1 3 9】



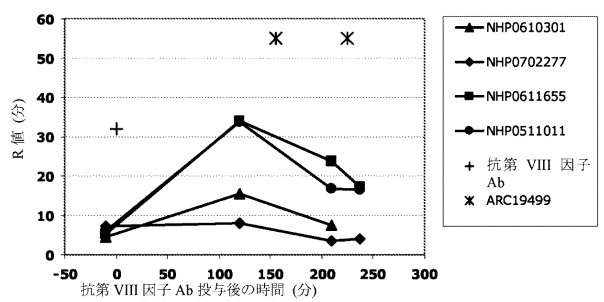
【図 1 3 6】

【図 1 3 6】



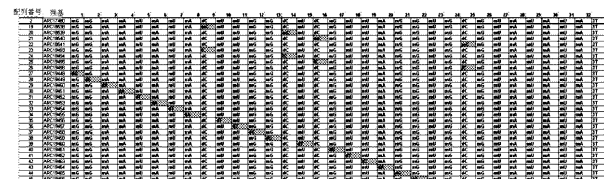
【図 1 3 7】

【図 1 3 7】



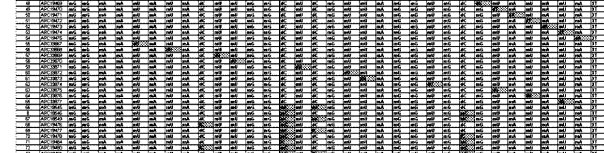
【図 1 4 0 - 1】

【図 1 4 0】



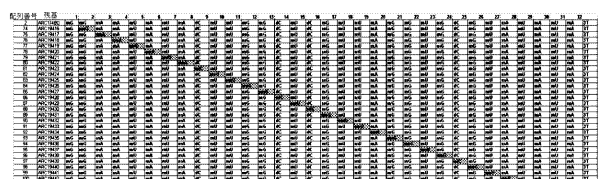
【図 1 4 0 - 2】

【図 1 4 0】



【図 1 4 1 - 1】

【図 1 4 1】



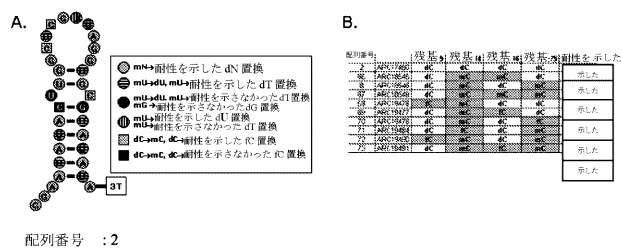
【図 1 4 1 - 2】

【図 1 4 1】



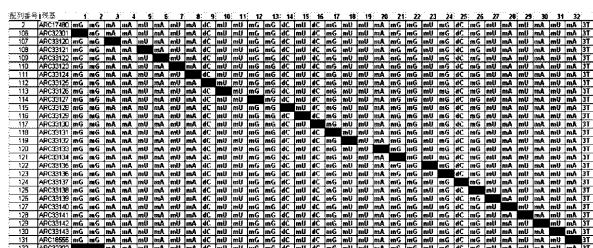
【图 142】

【图 1 4 2】

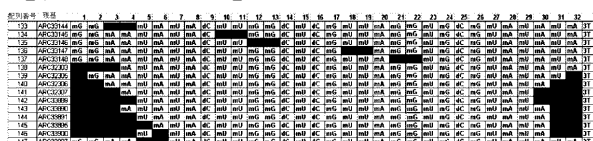


【例 143-1】

【例 143】

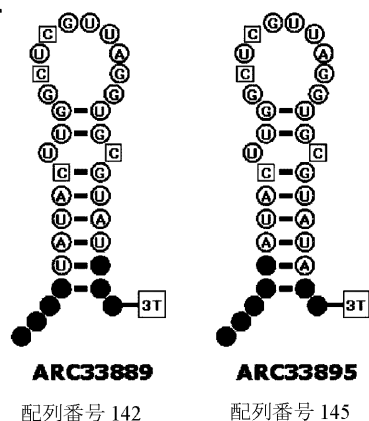


【例 143-2】



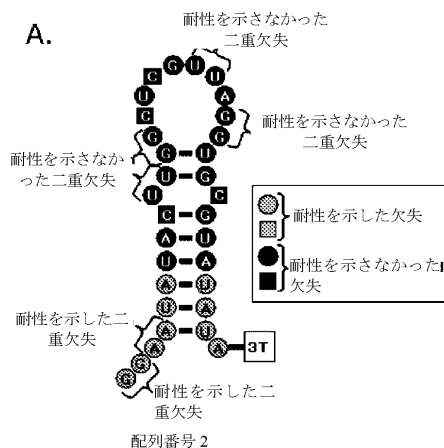
【図 1 4 4 B】

B.



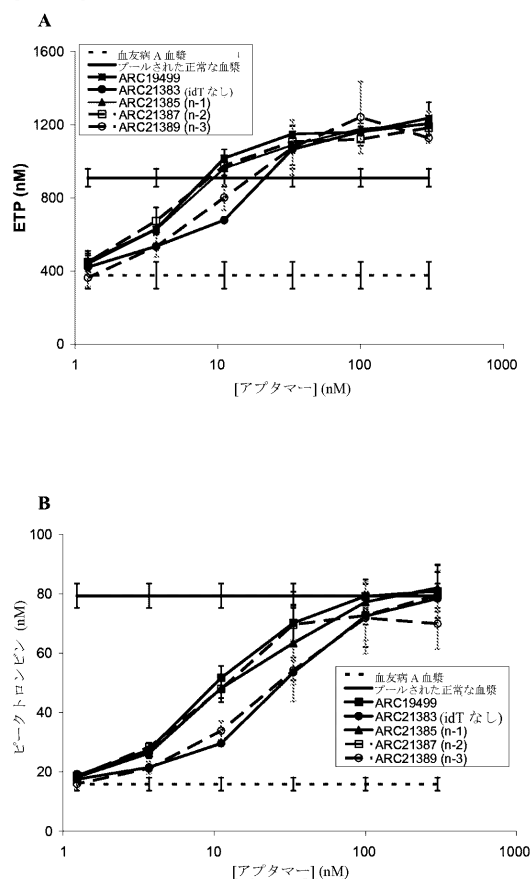
【图 144 A】

A.



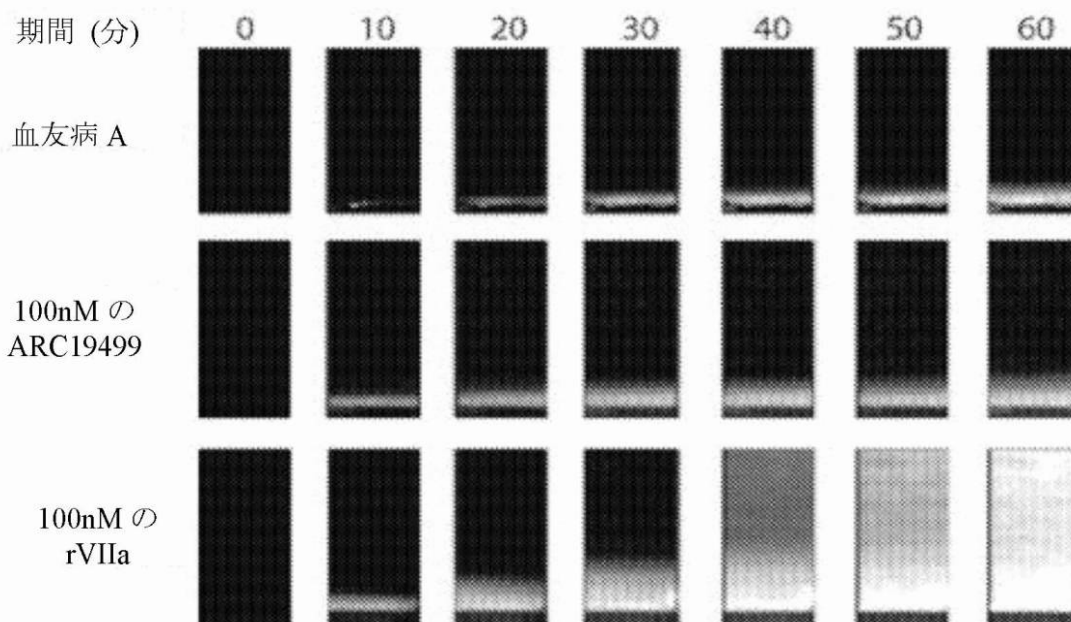
【图 1 4 5】

【图 1 4 5】



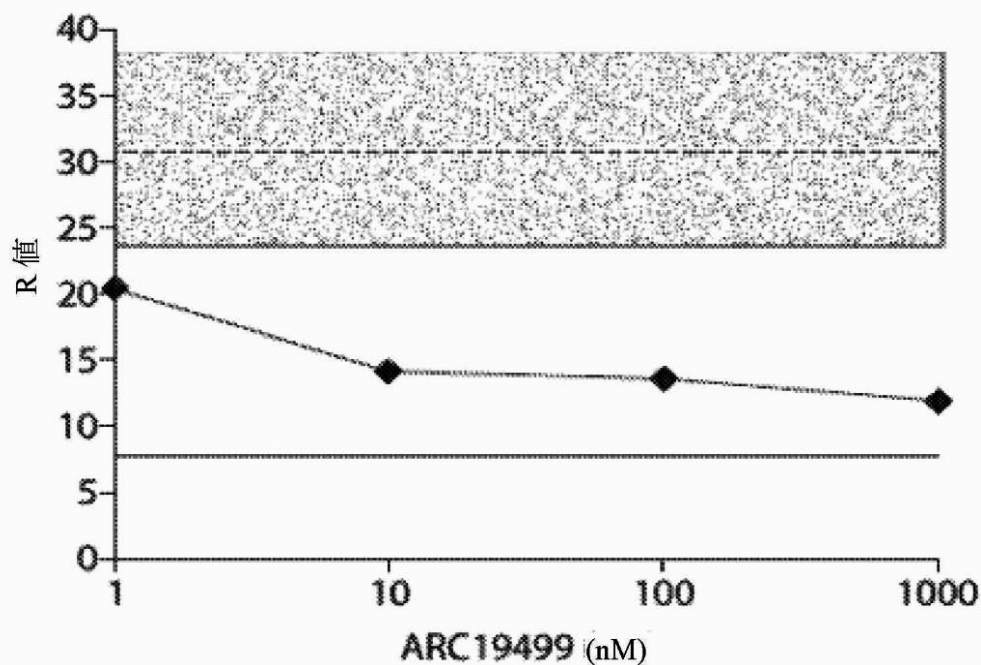
【図 6 3】

【図 6 3】



【図 1 1 4】

【図 1 1 4】



【配列表】

2013502218000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年6月17日(2011.6.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】図面

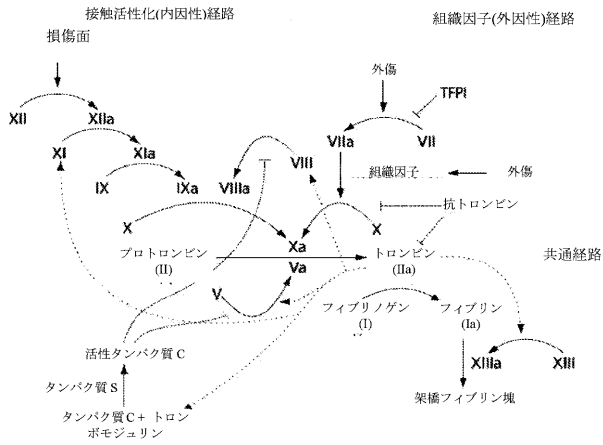
【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

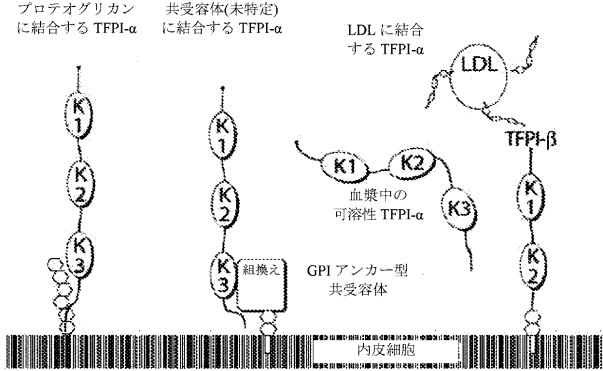
【図 1】

【図 1】

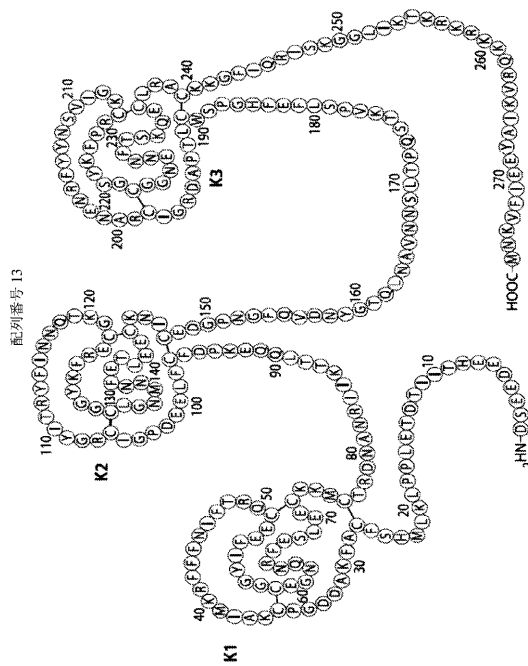


【図 2】

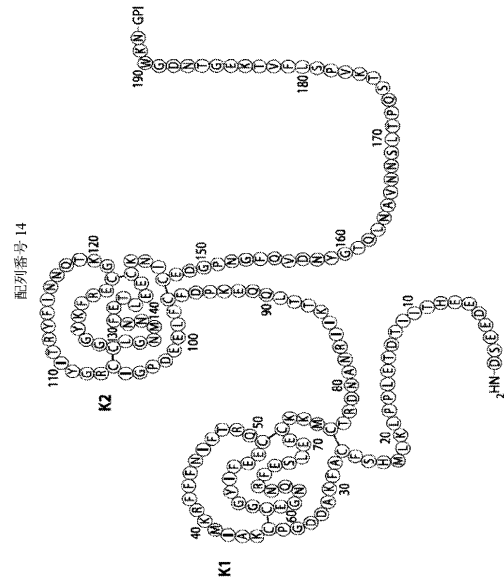
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】

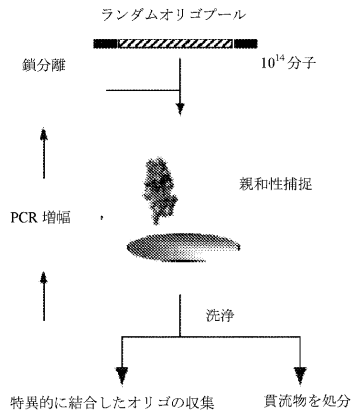


【図 3 A】

【図 3 B】

【図 4】

【図 4】



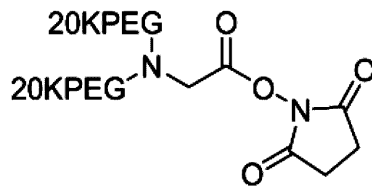
【図 5】

【図 5】

DSEEDDEHTIITDTLPPLKIMHSFCAFRADDGPKAIMKRRFFNIFTQCEEFIYGGCEGNQNRFSLEECKK
MCTRDNANRIIKTTLQKEKPFDFCFLEEDPGICRGVITRYFTNNQTRQCFKYGGLGNMNNFETLEECKNICE
DGFNGFQVDNYGTQLNAVNNSLTPQSTKVPSLFEFHGPGWCLTPADRGLCRANENRFYYNSVIGKCRPFYSGC
GGNNENFTSKQECLRACKKGPIQRISKGLIKTKRKKKQGVKIAYEELFVKHM (配列番号 11)

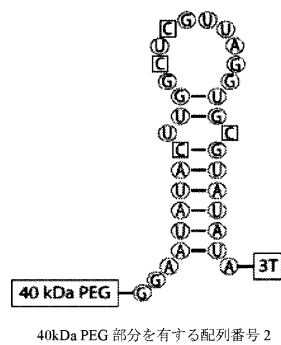
【図 6】

【図 6】



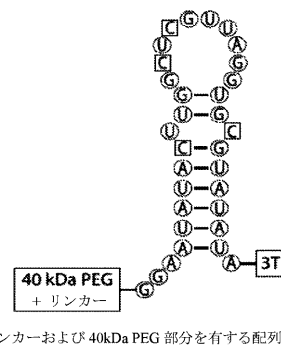
【図 10 A】

【図 10 A】



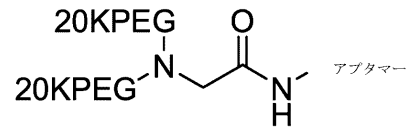
【図 10 B】

【図 10 B】



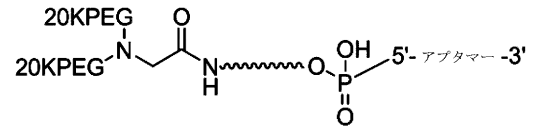
【図 7】

【図 7】



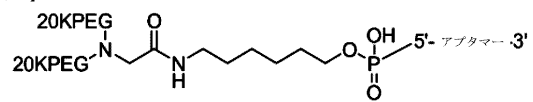
【図 8】

【図 8】



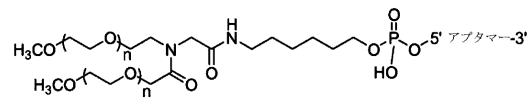
【図 9 A】

【図 9 A】



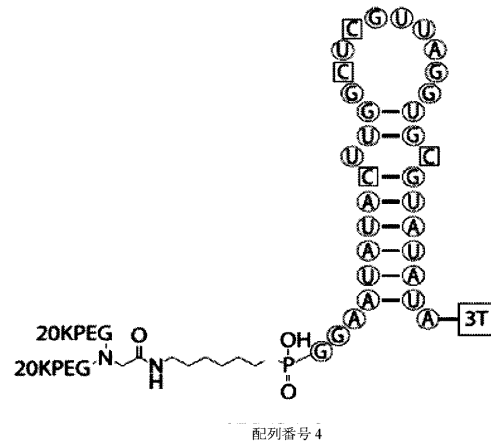
【図 9 B】

【図 9 B】



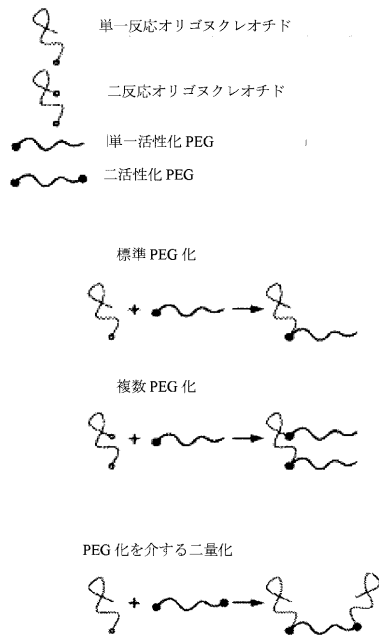
【図 10 C】

【図 10 C】



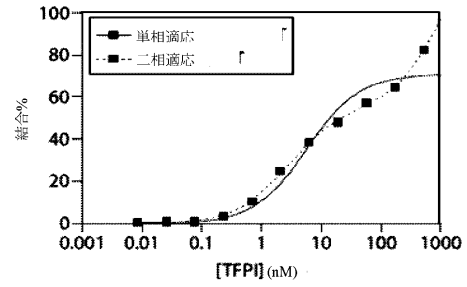
【図 1 1】

【図 1 1】



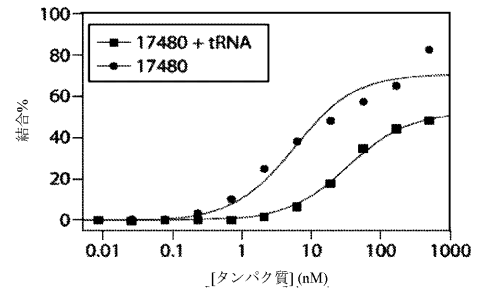
【図 1 2 A】

【図 1 2 A】



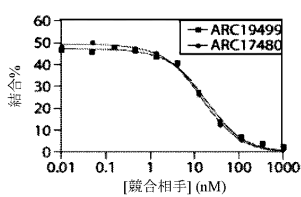
【図 1 2 B】

【図 1 2 B】

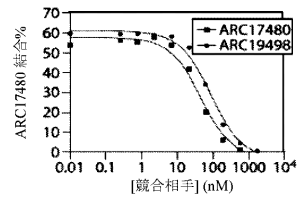


【図 1 3】

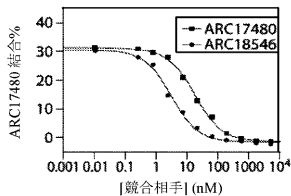
【図 1 3 A】



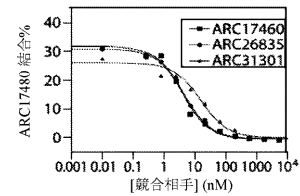
【図 1 3 B】



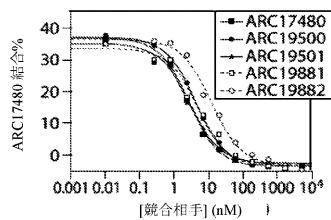
【図 1 3 C】



【図 1 3 D】

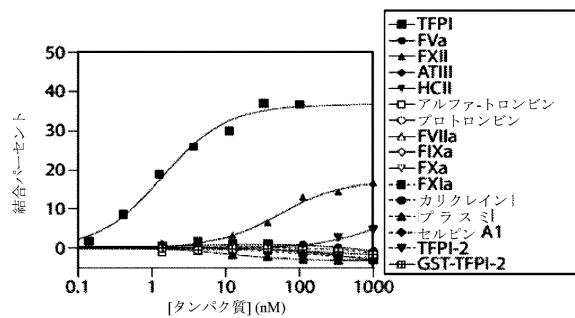


【図 1 3 E】



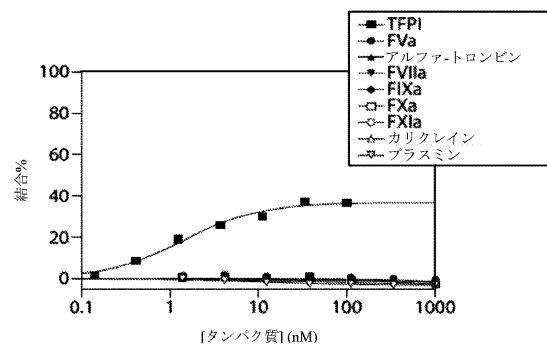
【図 1 4 A】

【図 1 4 A】



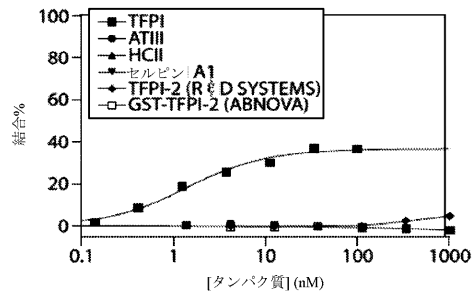
【図 1 4 B】

【図 1 4 B】



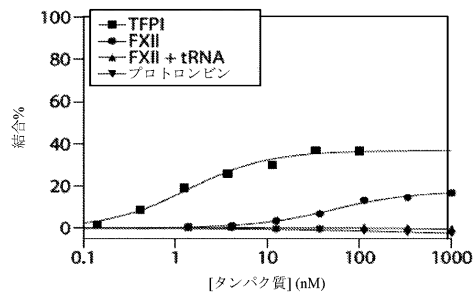
【図 1 4 C】

【図 1 4 C】



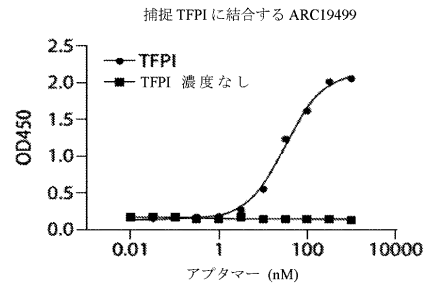
【図 1 4 D】

【図 1 4 D】



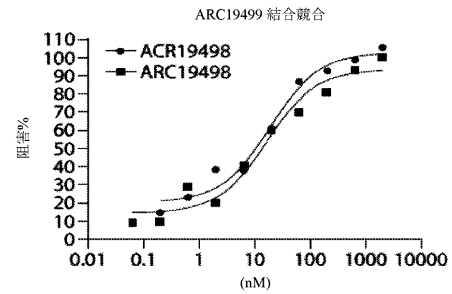
【図 1 5】

【図 1 5】



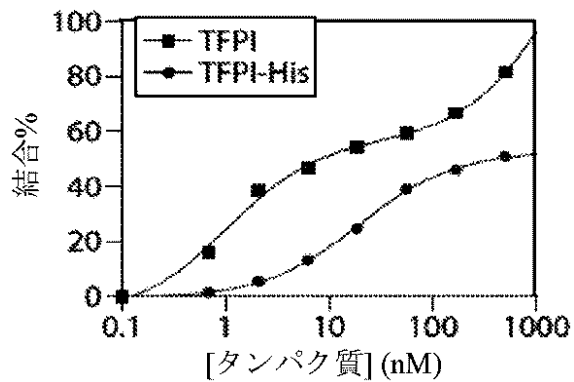
【図 1 6】

【図 1 6】



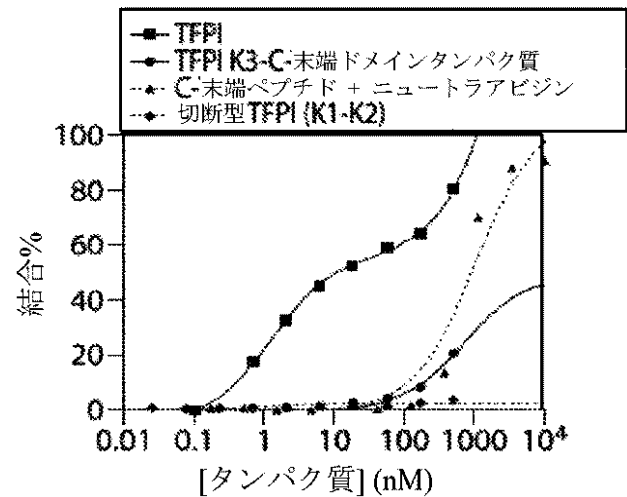
【図 1 7 A】

【図 1 7 A】



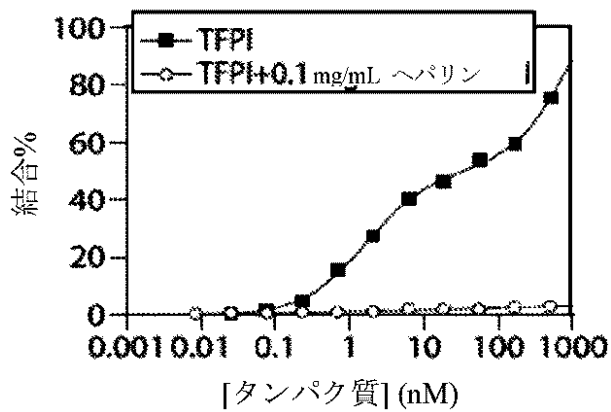
【図 1 7 B】

【図 1 7 B】



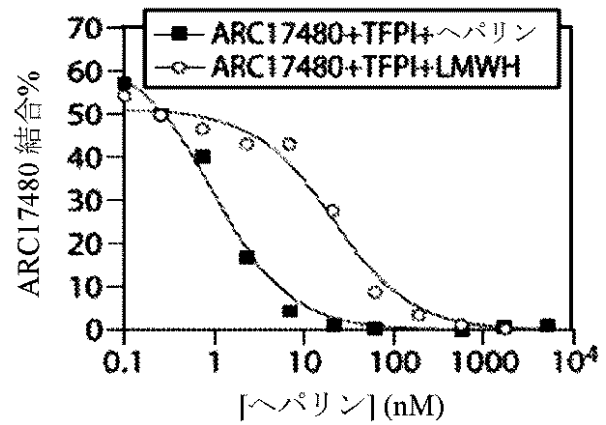
【図 18 A】

【図 18 A】



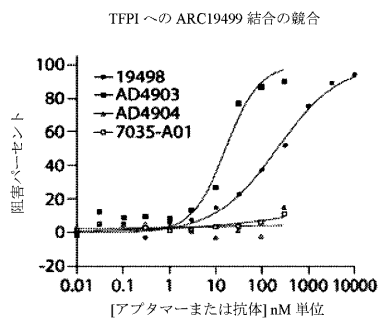
【図 18 B】

【図 18 B】

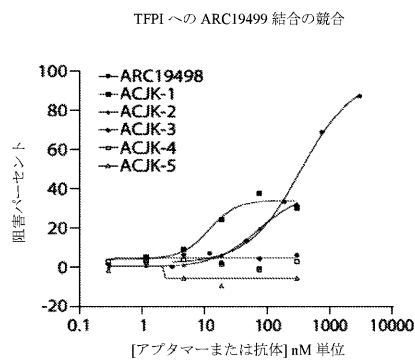


【図 19】

【図 19 A】

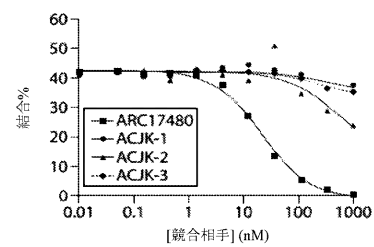


【図 19 B】

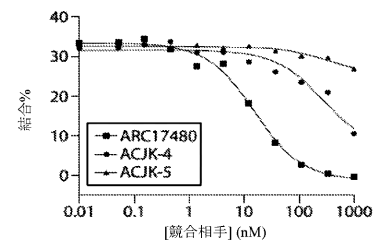


【図 20】

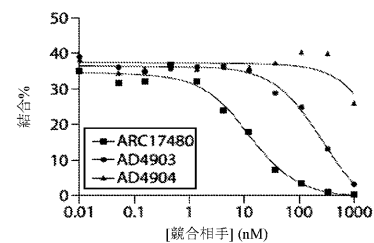
【図 20 A】



【図 20 B】

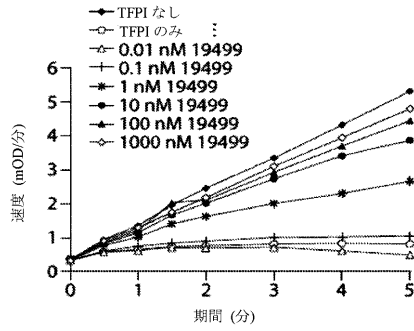


【図 20 C】

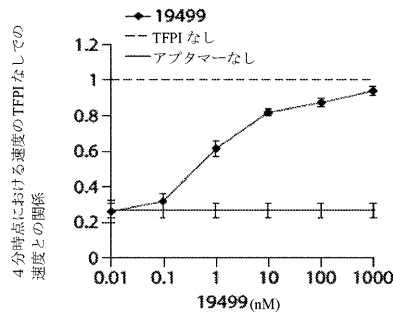


【図 2 1】

【図 2 1 A】

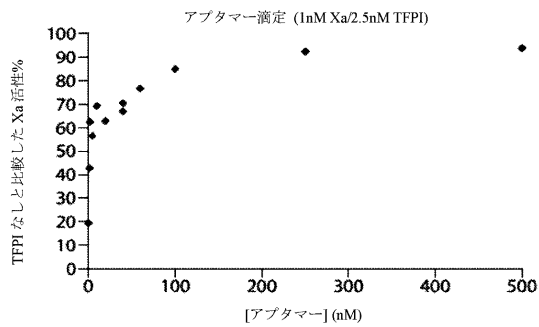


【図 2 1 B】



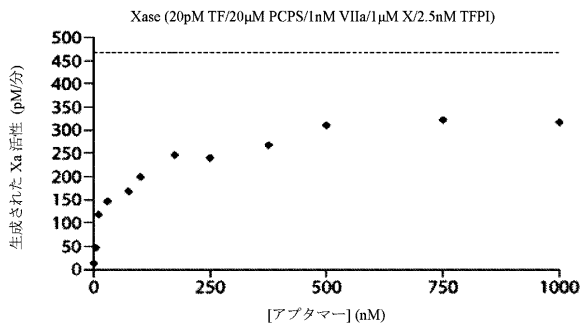
【図 2 3】

【図 2 3】



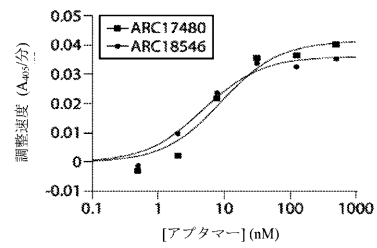
【図 2 4】

【図 2 4】

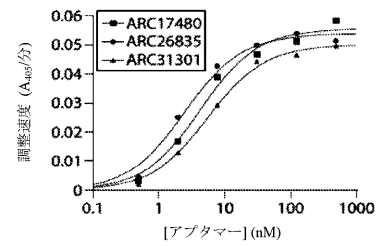


【図 2 2】

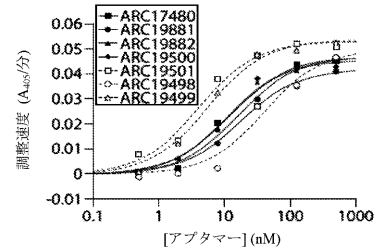
【図 2 2 A】



【図 2 2 B】

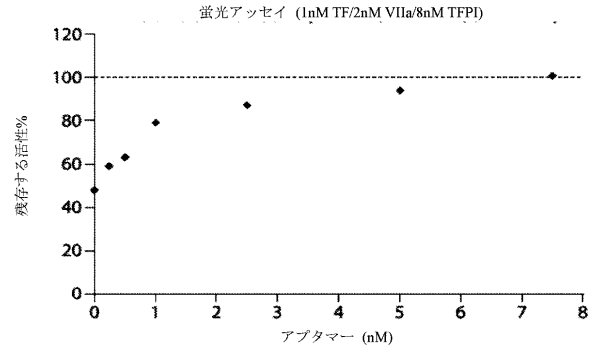


【図 2 2 C】



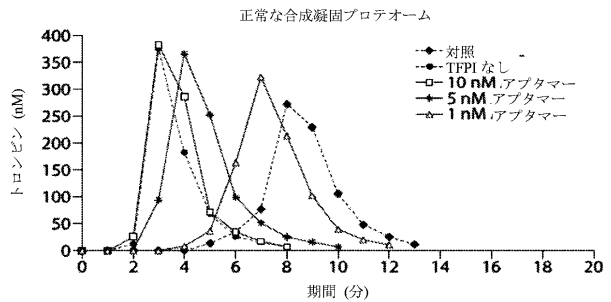
【図 2 5】

【図 2 5】



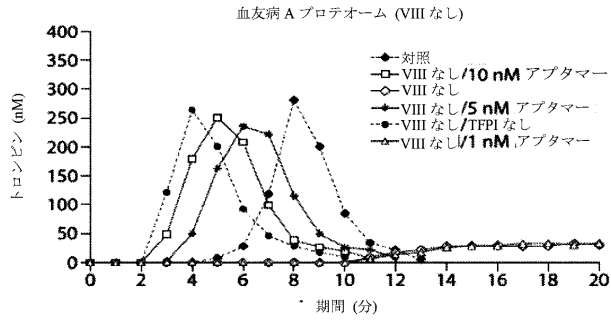
【図 2 6】

【図 2 6】



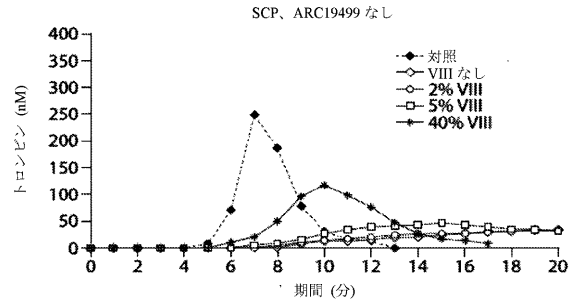
【図 27】

【図 27】



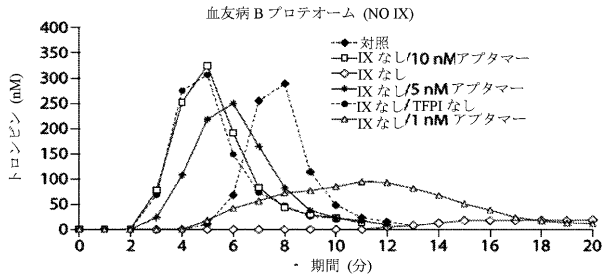
【図 29】

【図 29】



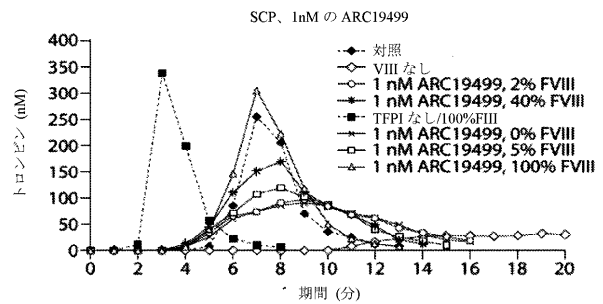
【図 28】

【図 28】



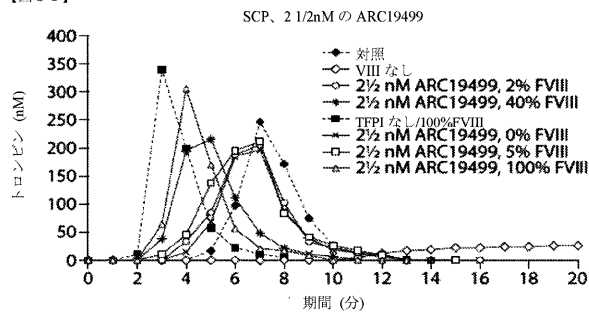
【図 30】

【図 30】



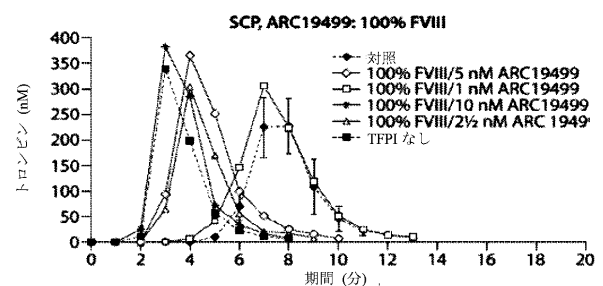
【図 31】

【図 31】



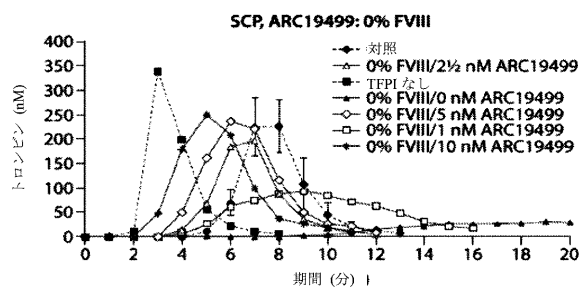
【図 33】

【図 33】



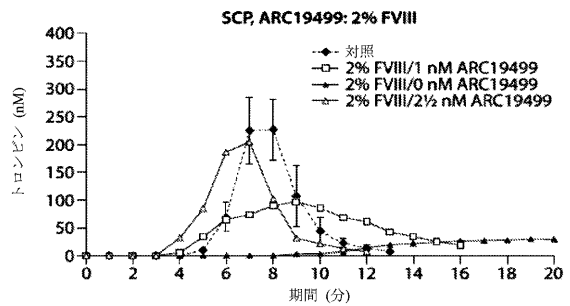
【図 32】

【図 32】



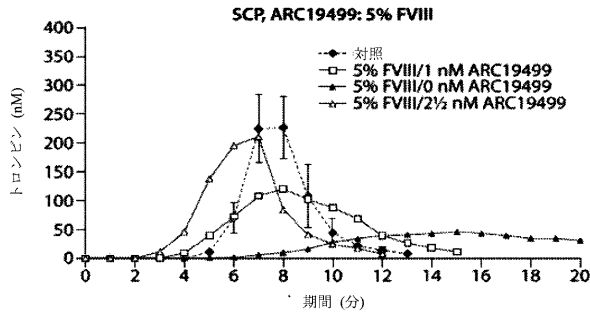
【図 34】

【図 34】



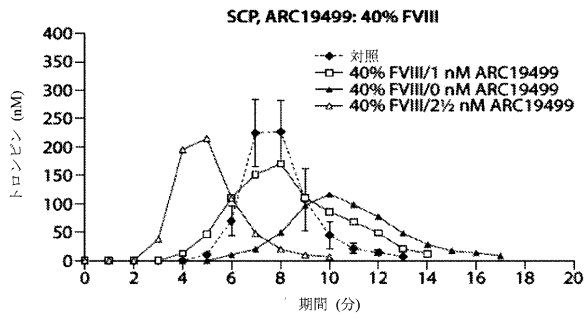
【図 3 5】

【図 3 5】



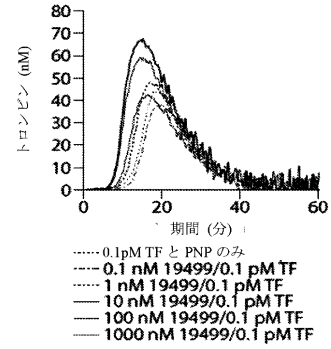
【図 3 6】

【図 3 6】



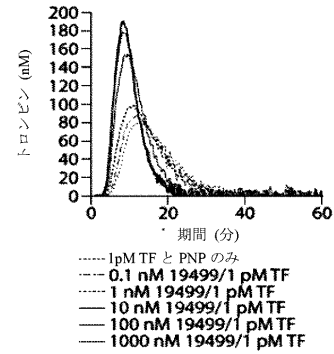
【図 3 7 A】

【図 3 7 A】



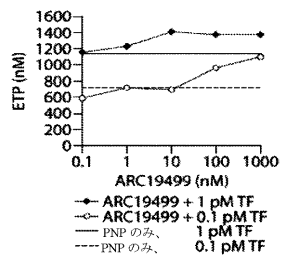
【図 3 7 B】

【図 3 7 B】



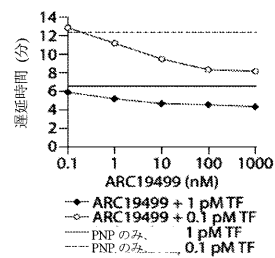
【図 3 7 C】

【図 3 7 C】



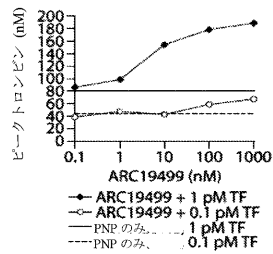
【図 3 7 E】

【図 3 7 E】



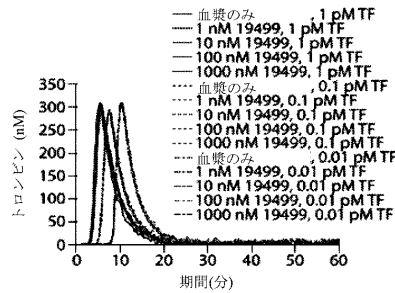
【図 3 7 D】

【図 3 7 D】

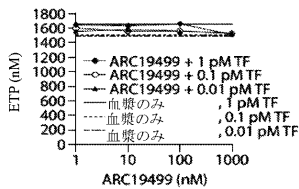


【図 38】

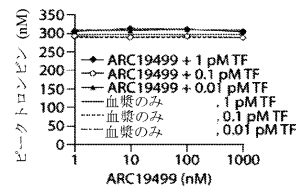
【図 38 A】



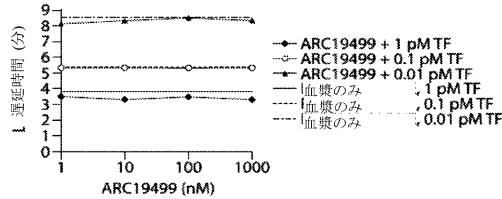
【図 38 B】



【図 38 C】

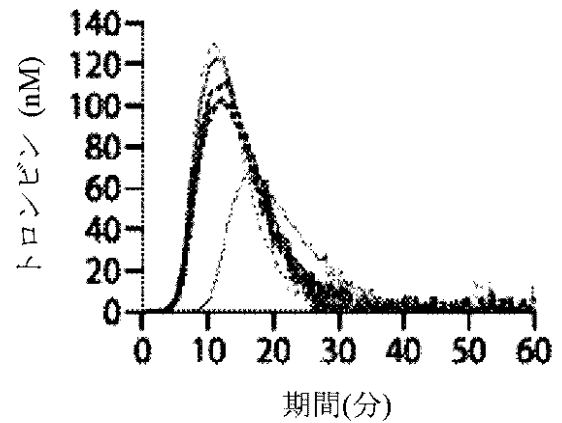


【図 38 D】



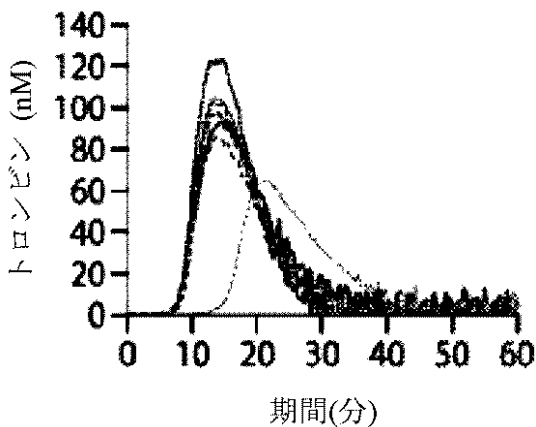
【図 39 A】

【図 39 A】



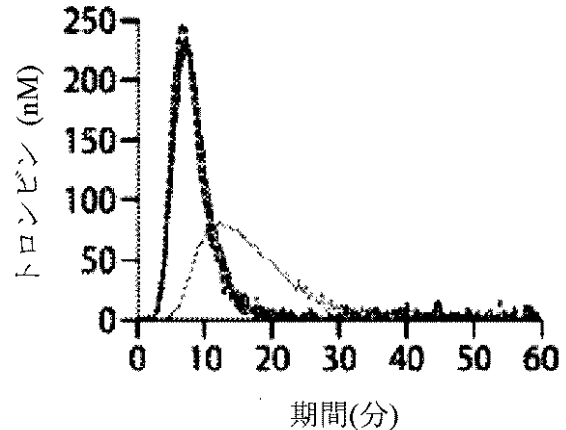
【図 39 B】

【図 39 B】



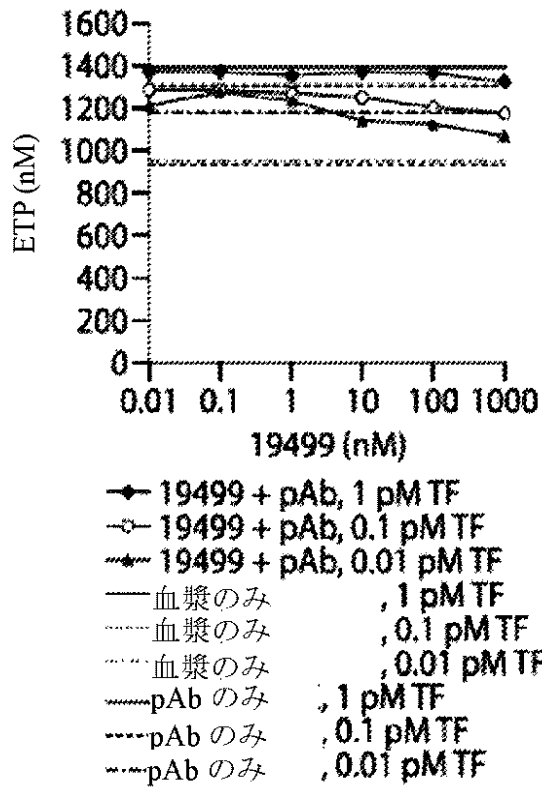
【図 39 C】

【図 39 C】



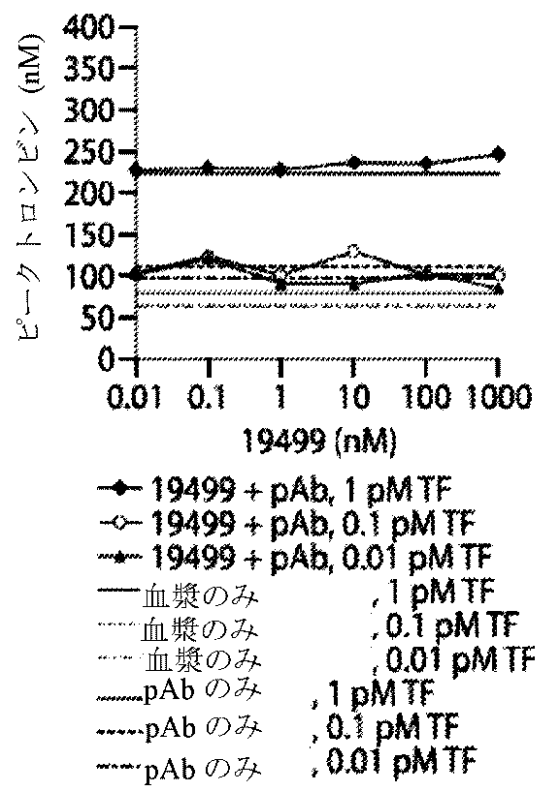
【図 3 9 D】

【図 3 9 D】



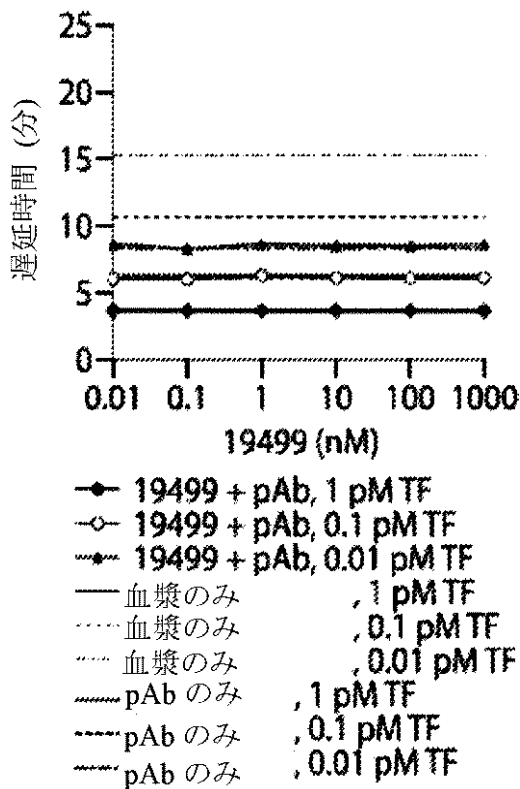
【図 3 9 E】

【図 3 9 E】



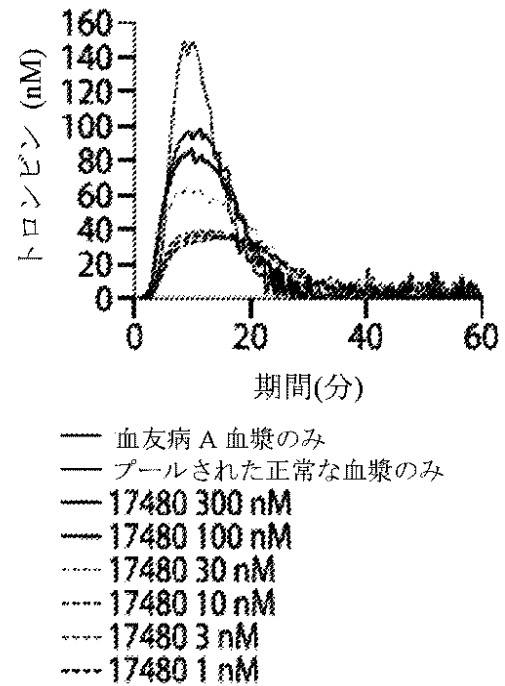
【図 3 9 F】

【図 3 9 F】



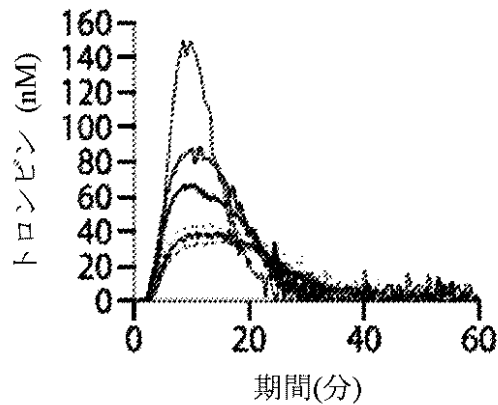
【図 4 0 A】

【図 4 0 A】



【図 4 0 B】

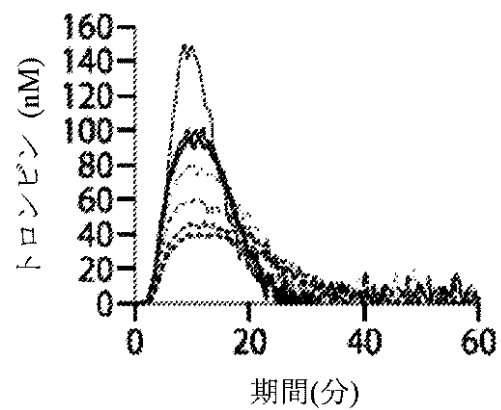
【図 4 0 B】



— 血友病 A 血漿のみ
 - - プールされた正常な血漿のみ
 — 19498 300 nM
 — 19498 100 nM
 19498 30 nM
 - - - 19498 10 nM
 19498 3 nM
 19498 1 nM

【図 4 0 C】

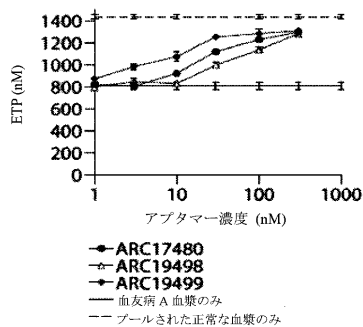
【図 4 0 C】



— 血友病 A 血漿のみ
 プールされた正常な血漿のみ
 — 19499 300 nM
 — 19499 100 nM
 19499 30 nM
 - - - 19499 10 nM
 19499 3 nM
 19499 1 nM

【図 4 0 D】

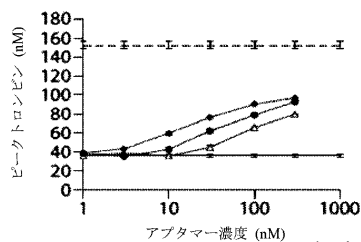
【図 4 0 D】



● ARC17480
 ▲ ARC19498
 ■ ARC19499
 — 血友病 A 血漿のみ
 - - プールされた正常な血漿のみ

【図 4 0 E】

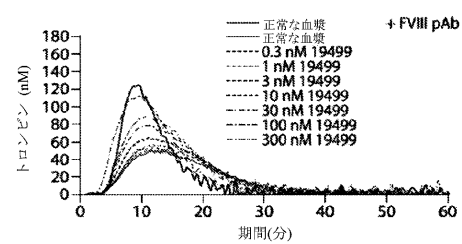
【図 4 0 E】



● ARC17480
 ▲ ARC19498
 ■ ARC19499
 — 血友病 A 血漿のみ
 - - プールされた正常な血漿のみ

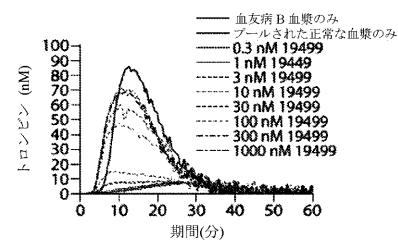
【図 4 1】

【図 4 1】

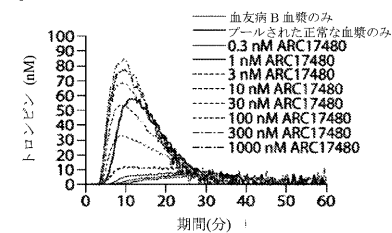


【図 4 2】

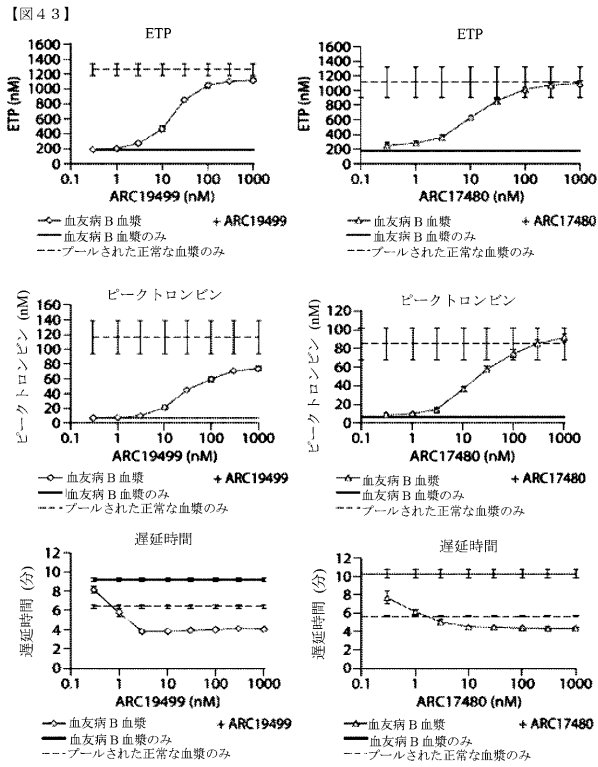
【図 4 2 A】



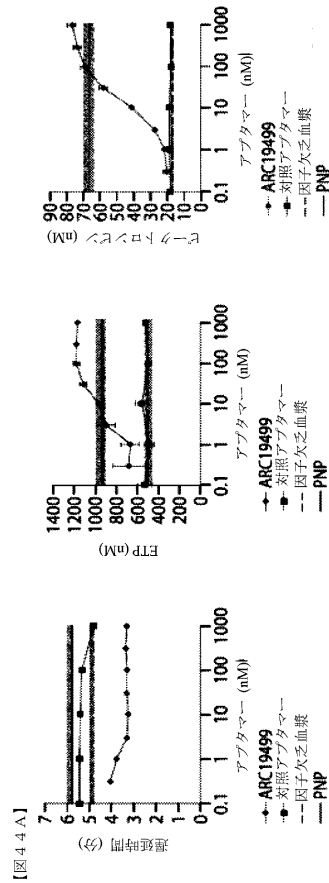
【図 4 2 B】



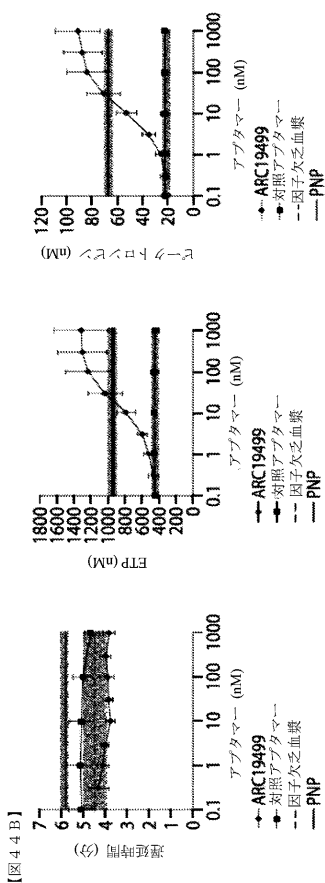
【図 4 3】



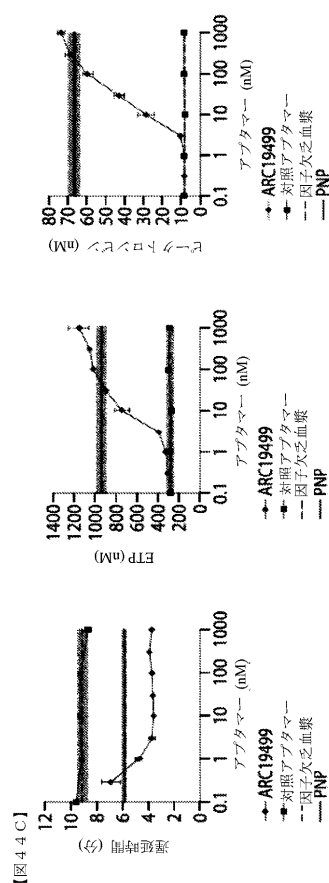
【図 4 4 A】



【図 4 4 B】

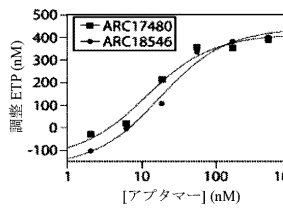


【図 4 4 C】

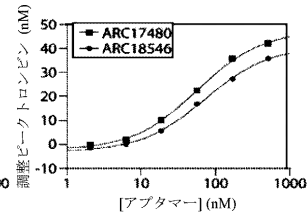


【図 4 5】

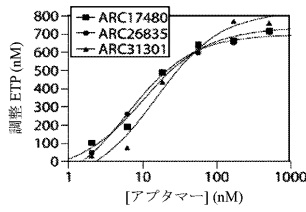
【図 4 5 A】



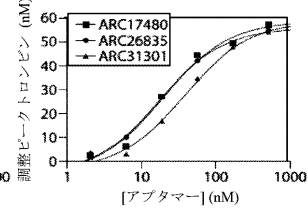
【図 4 5 B】



【図 4 5 C】

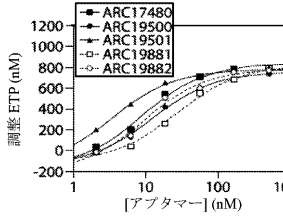


【図 4 5 D】

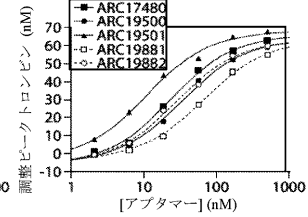


【図 4 6】

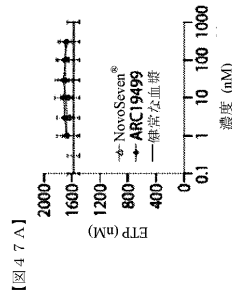
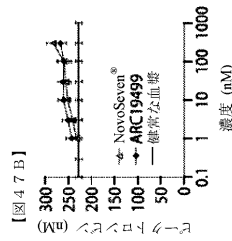
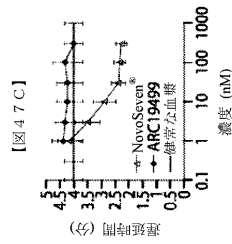
【図 4 6 A】



【図 4 6 B】

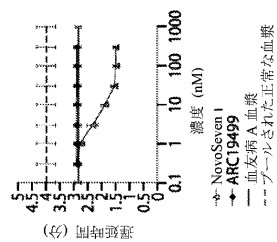


【図 4 7】

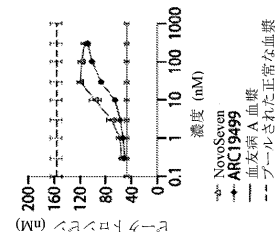


【図 4 8】

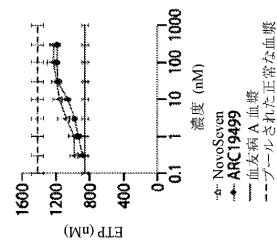
【図 4 8 C】



【図 4 8 B】

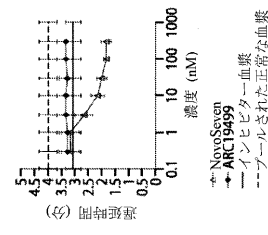


【図 4 8 A】

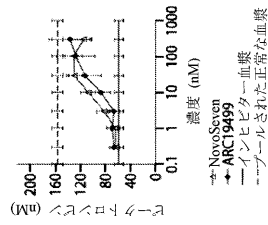


【図 4 9】

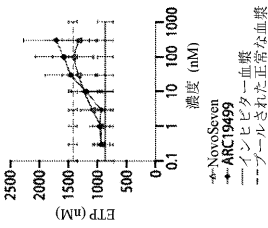
【図 4 9 C】



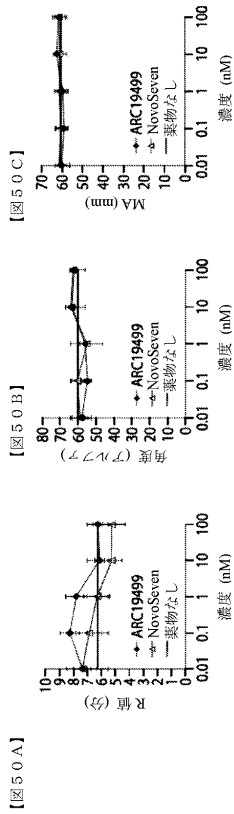
【図 4 9 B】



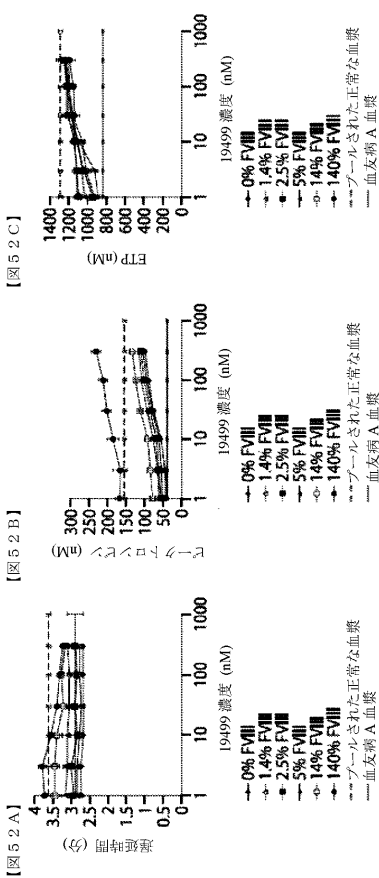
【図 4 9 A】



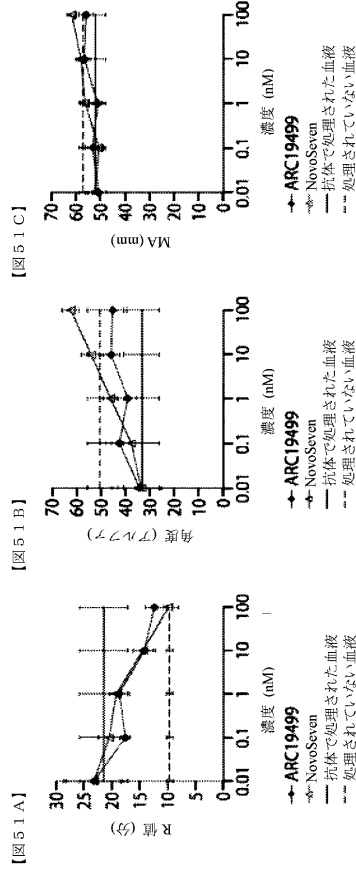
【図 5 0】



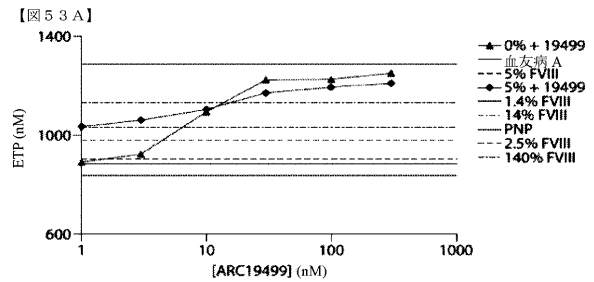
【図 5 2】



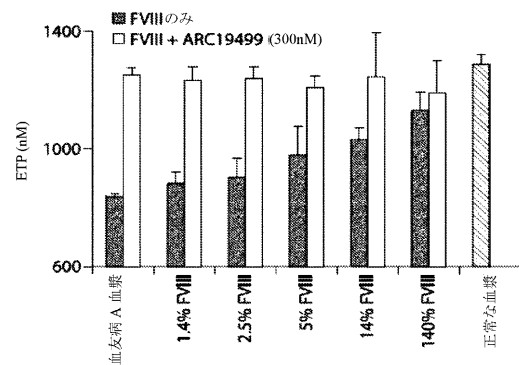
【図 5 1】



【図 5 3】

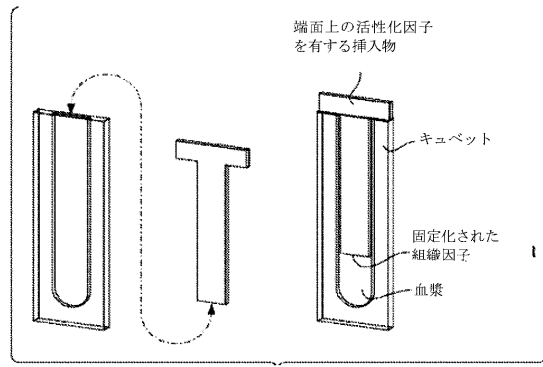


【図 5 3 B】



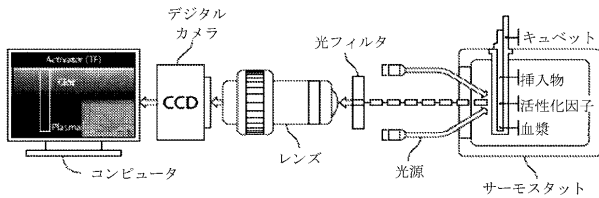
【図 5 4 A】

【図 5 4 A】



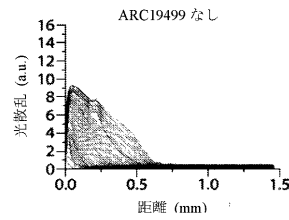
【図 5 4 B】

【図 5 4 B】

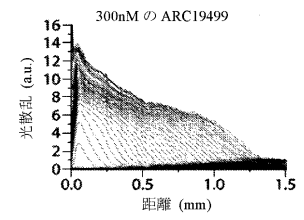


【図 5 5】

【図 5 5 A】

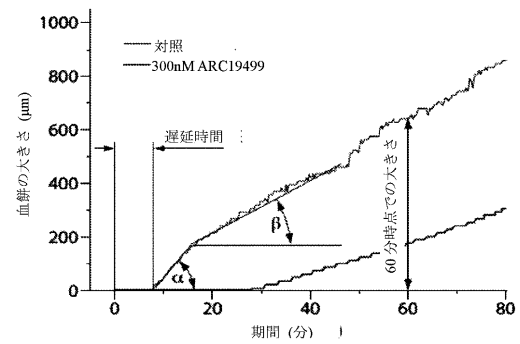


【図 5 5 B】



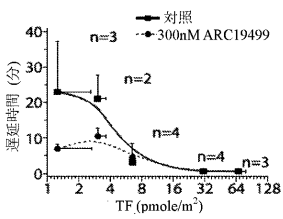
【図 5 6】

【図 5 6】

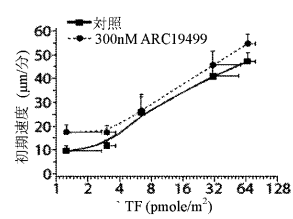


【図 5 7】

【図 5 7 A】

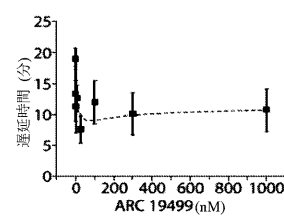


【図 5 7 B】

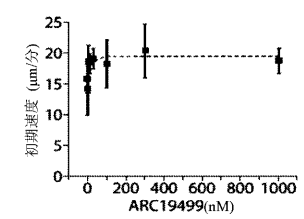


【図 5 8】

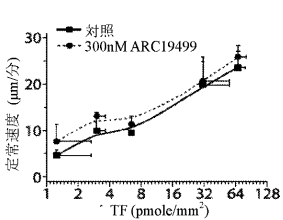
【図 5 8 A】



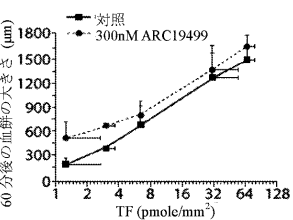
【図 5 8 B】



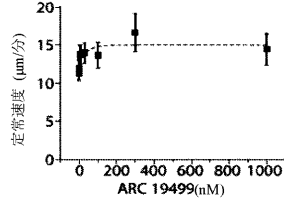
【図 5 7 C】



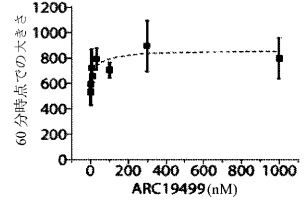
【図 5 7 D】



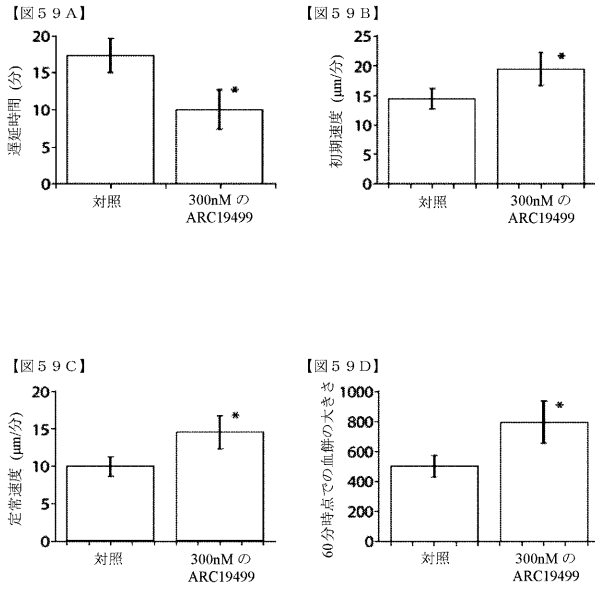
【図 5 8 C】



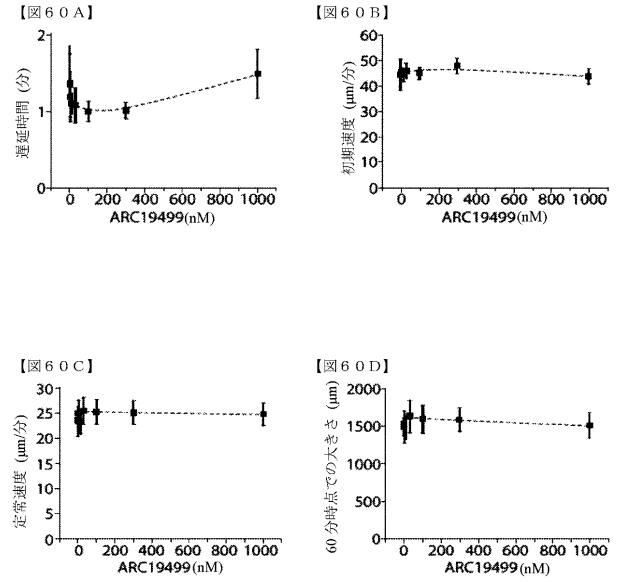
【図 5 8 D】



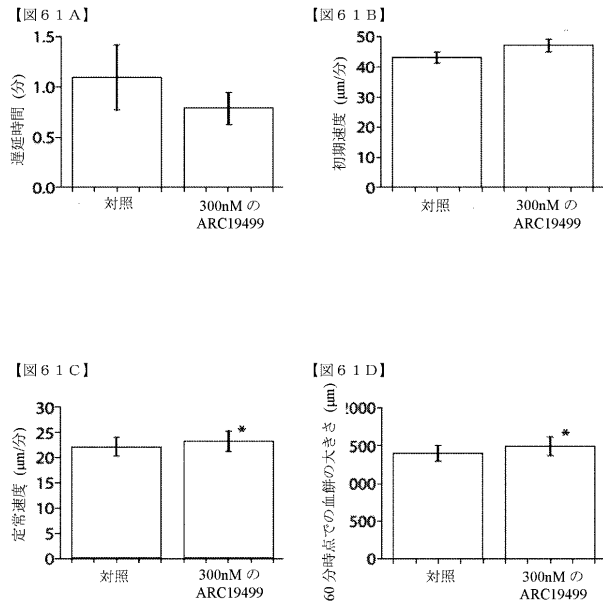
【図 59】



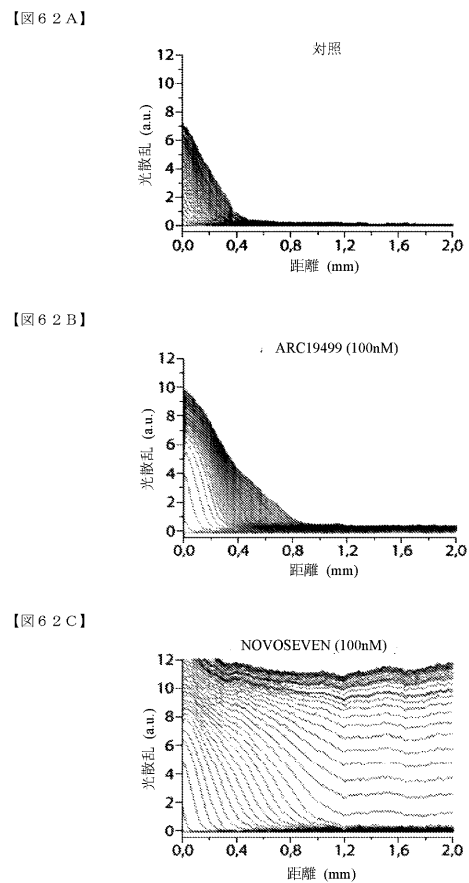
【図 60】



【図 61】

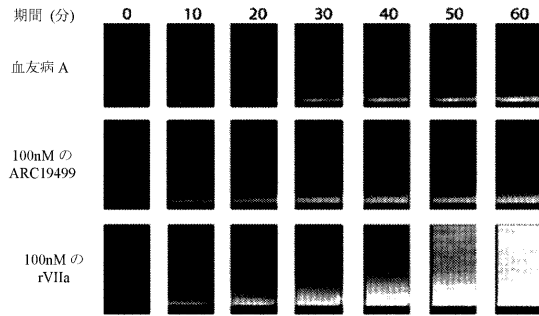


【図 62】



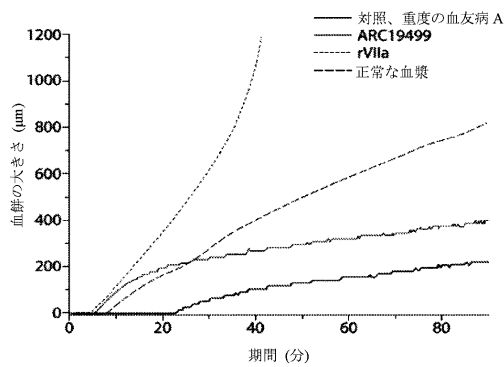
【図 6 3】

【図 6 3】



【図 6 4】

【図 6 4】



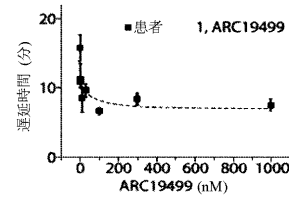
【図 6 5】

【図 6 5】

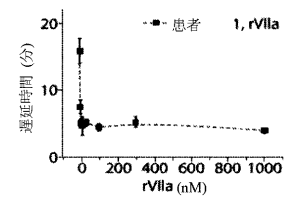
患者番号	年齢	毎月の出血イベント	実験日の第 VIII 因子レベル, %	APTT, 秒
1	21	0-1	<1	103
2	24	1-2	2.1	82
3	43	1-2	1.2	86
4	48	1-2	1.4	80
5	21	1-2	<1	120
6	36	2-3	<1	102
7	19	3-5	2.8	99
8	30	0-1	<1	124

【図 6 6】

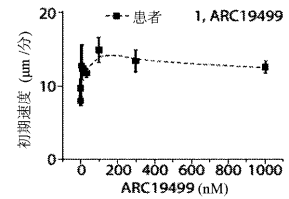
【図 6 6 A】



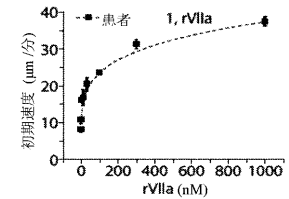
【図 6 6 B】



【図 6 6 C】

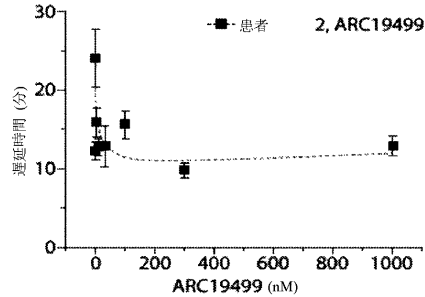


【図 6 6 D】



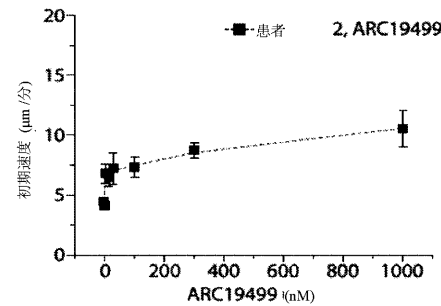
【図 6 7 A】

【図 6 7 A】



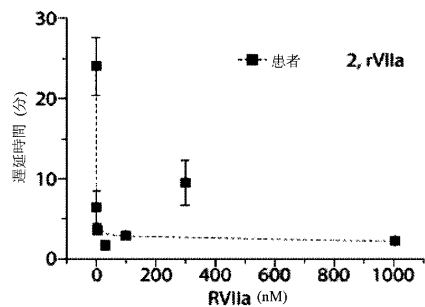
【図 6 7 C】

【図 6 7 C】



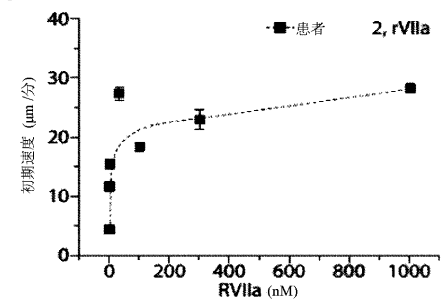
【図 6 7 B】

【図 6 7 B】



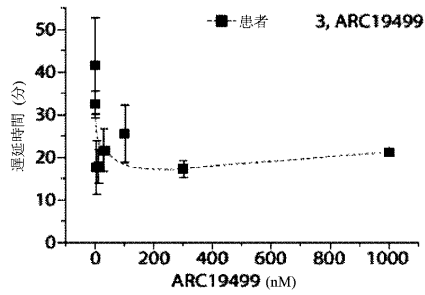
【図 6 7 D】

【図 6 7 D】



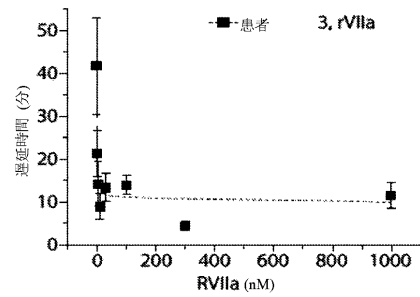
【図 68 A】

【図 68 A】



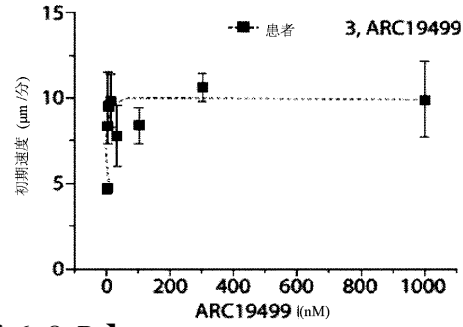
【図 68 B】

【図 68 B】



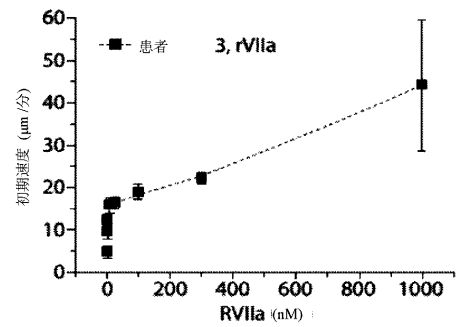
【図 68 C】

【図 68 C】



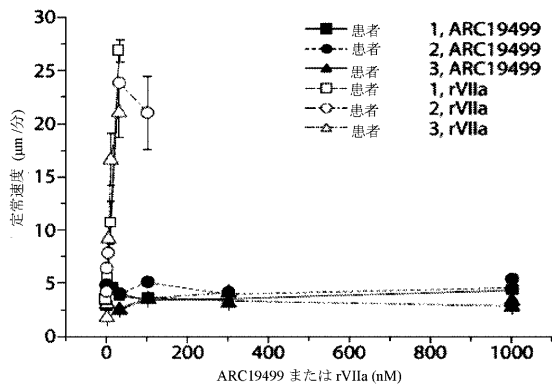
【図 68 D】

【図 68 D】



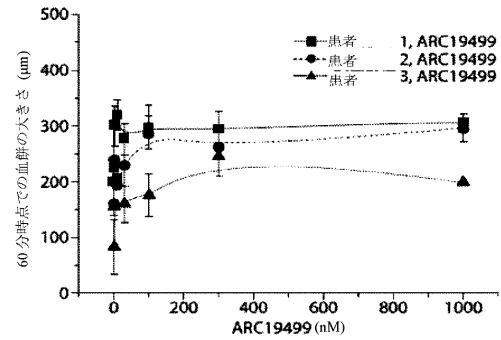
【図 69】

【図 69】

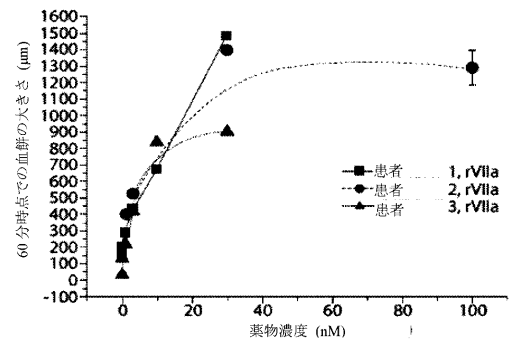


【図 70】

【図 70 A】

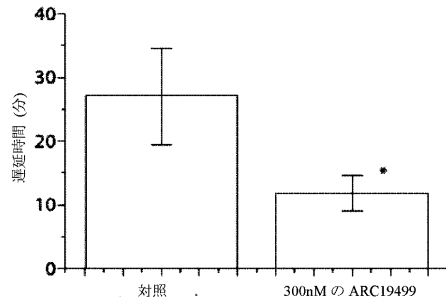


【図 70 B】



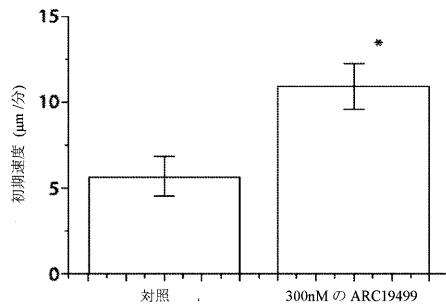
【図 7 1 A】

【図 7 1 A】



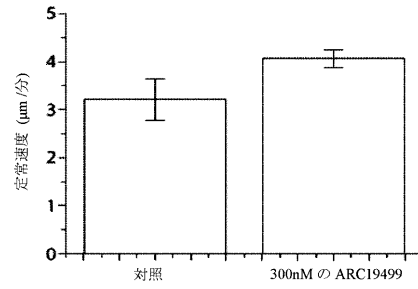
【図 7 1 B】

【図 7 1 B】



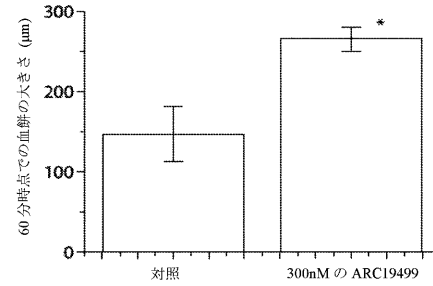
【図 7 1 C】

【図 7 1 C】



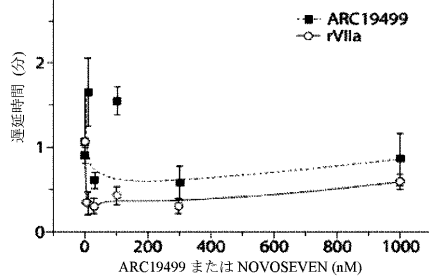
【図 7 1 D】

【図 7 1 D】



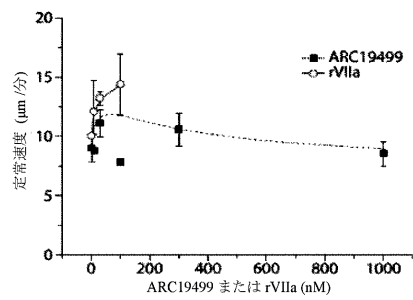
【図 7 2 A】

【図 7 2 A】



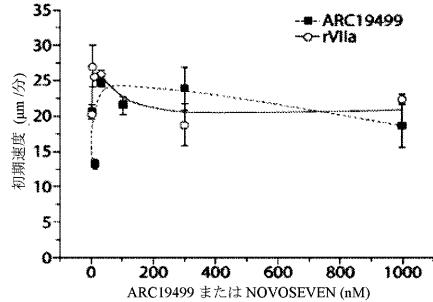
【図 7 2 C】

【図 7 2 C】



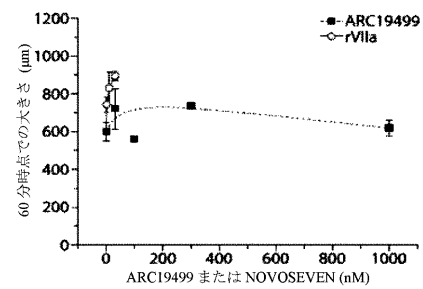
【図 7 2 B】

【図 7 2 B】



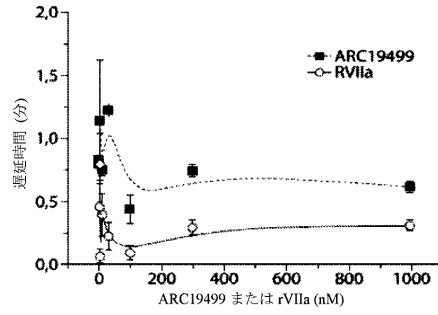
【図 7 2 D】

【図 7 2 D】



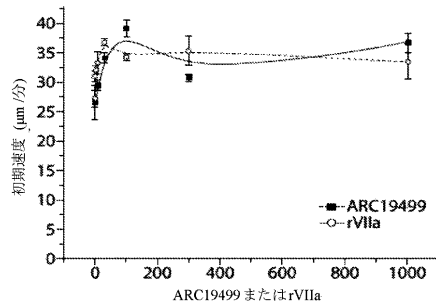
【図 7 3 A】

【図 7 3 A】



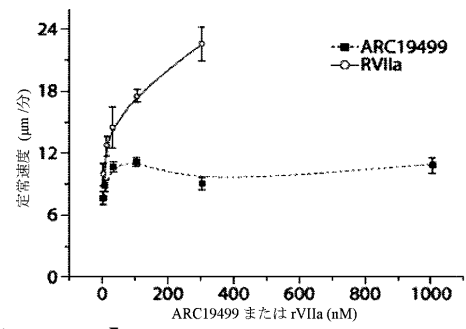
【図 7 3 B】

【図 7 3 B】



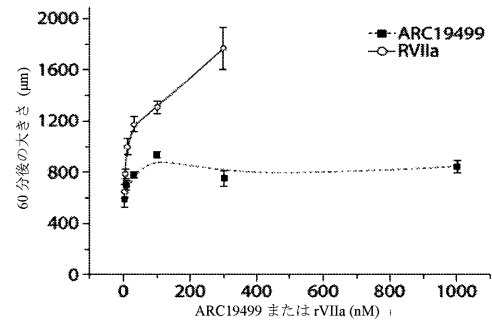
【図 7 3 C】

【図 7 3 C】



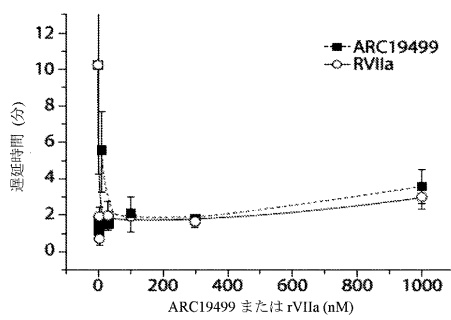
【図 7 3 D】

【図 7 3 D】



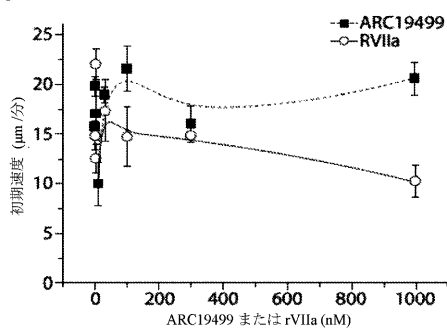
【図 7 4 A】

【図 7 4 A】



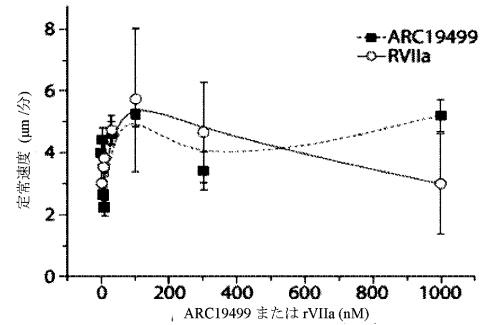
【図 7 4 B】

【図 7 4 B】



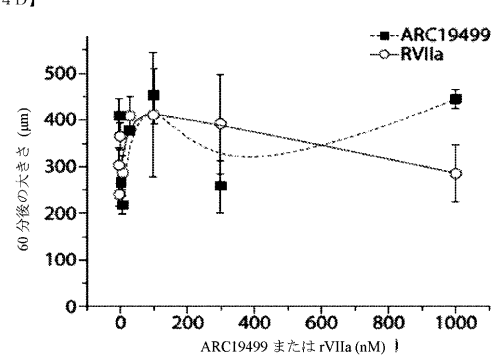
【図 7 4 C】

【図 7 4 C】



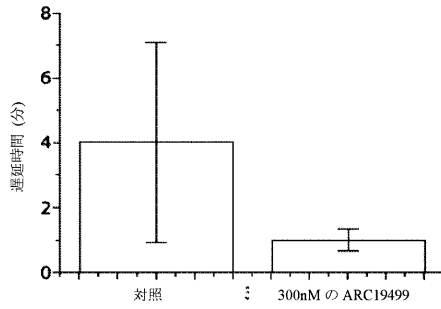
【図 7 4 D】

【図 7 4 D】



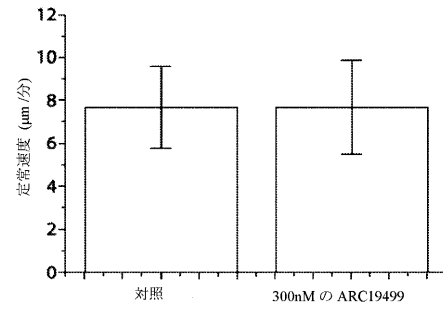
【図 7 5 A】

【図 7 5 A】



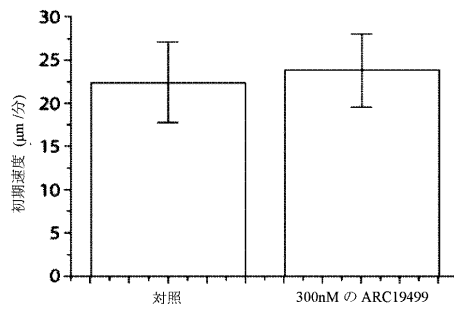
【図 7 5 C】

【図 7 5 C】



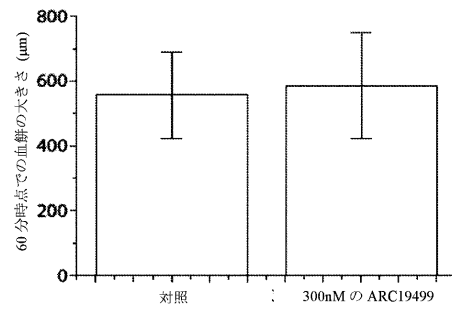
【図 7 5 B】

【図 7 5 B】



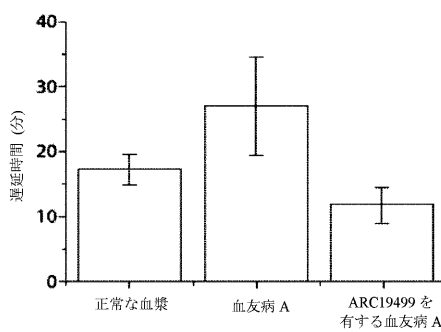
【図 7 5 D】

【図 7 5 D】



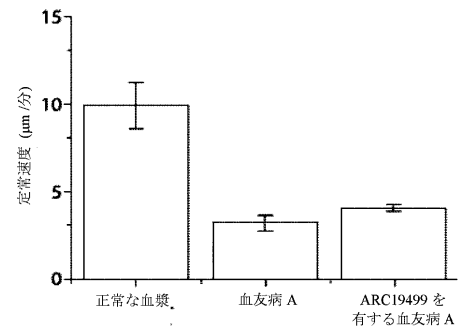
【図 7 6 A】

【図 7 6 A】



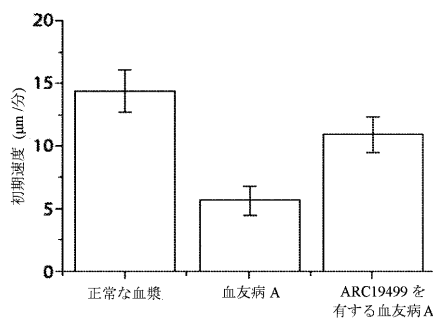
【図 7 6 C】

【図 7 6 C】



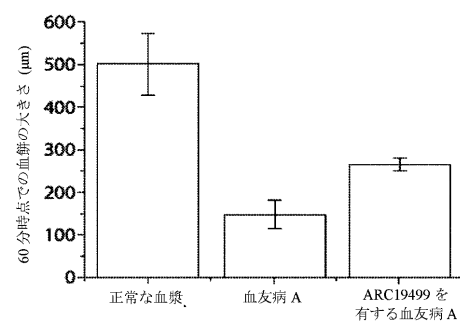
【図 7 6 B】

【図 7 6 B】



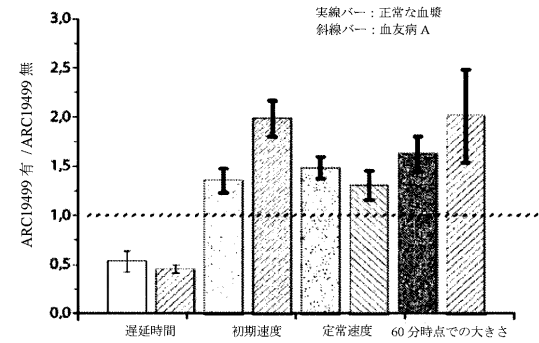
【図 7 6 D】

【図 7 6 D】



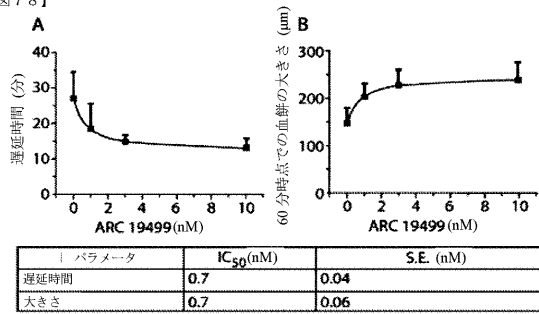
【図 7 7】

【図 7 7】



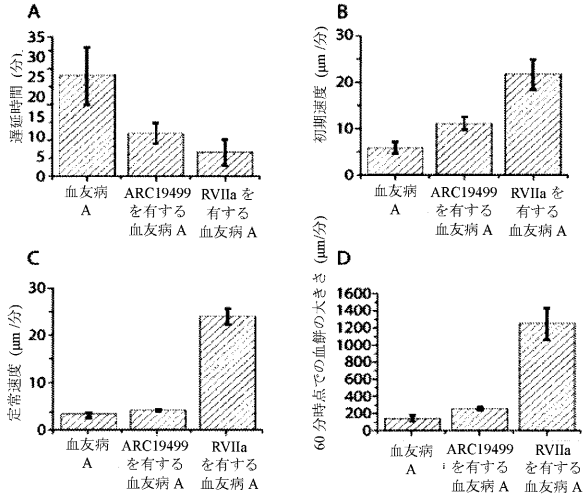
【図 7 8】

【図 7 8】



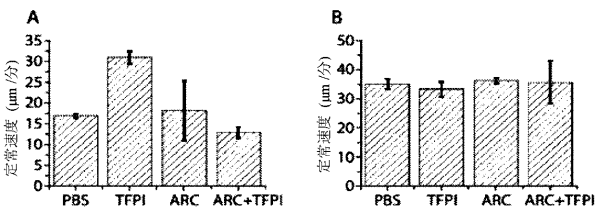
【図 7 9】

【図 7 9】



【図 8 0】

【図 8 0】



【図 8 1】

【図 8 1】

正常な対象由来の全血の TF-ACT			
[ARC19499] (nM)	#2 (N) (秒)	#6 (N) (秒)	#7 (N) (秒)
700		311	
350	317	287	277
175	278	295	293
88	319	305	258
44			267
0	353	342	311

血友病 B 対象由来の全血の TF-ACT		
[ARC19499] (nM)	#4 (B) (秒)	#9 (B) (秒)
350	438	522
175	435	457/510
88	323	420
44	460	510
0	528	580

血友病 A 対象由来の全血の TF-ACT							
[ARC19499] (nM)	#1 (A) (秒)	#3 (A) (秒)	#5 (A) (秒)	#8 (A) (秒)	#10 (A) (秒)	#11 (A) (秒)	#12 (A) (秒)
3115	264						
1558	313						
1400						455	299
800	256						
700		551/500	489		416	634	281
350		444	434	483	418	347	295
175		457	392	453	456	491	291
88			468	464		456	306
44					477		
0	578	651	540	642	527	783	328

【図 8 2】

【図 8 2】

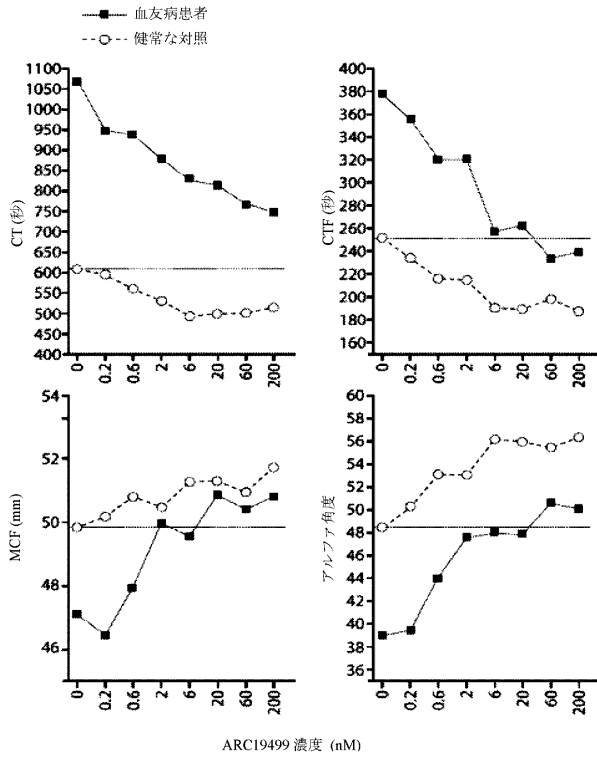
正常な対象由来の血漿の希釈 PT			
[ARC19499] (nM)	#2 (N) (秒)	#6 (N) (秒)	#7 (N) (秒)
500	179	185	174
125	183	225	168
32	181	242	170
8	191	246	176
2	294	274	265
0	>360	>360	>360

血友病 B 対象由来の血漿の希釈 PT		
[ARC19499] (nM)	#4 (B) (秒)	#9 (B) (秒)
500	215	185
125	227	189
32	225	192
8	241	210
2	>360	>360
0	>360	>360

血友病 A 対象由来の血漿の希釈 PT							
[ARC19499] (nM)	#1 (A) (秒)	#3 (A) (秒)	#5 (A) (秒)	#8 (A) (秒)	#10 (A) (秒)	#11 (A) (秒)	#12 (A) (秒)
500	163	162	162	156	154	162	>360
125	167	164	163	157	156	168	>360
32	171	168	164	163	157	171	>360
8	185	193	175	192	163	195	>360
2	>360	>360	>360	>360	169	>360	>360
0	>360	>360	>360	>360	169	>360	>360

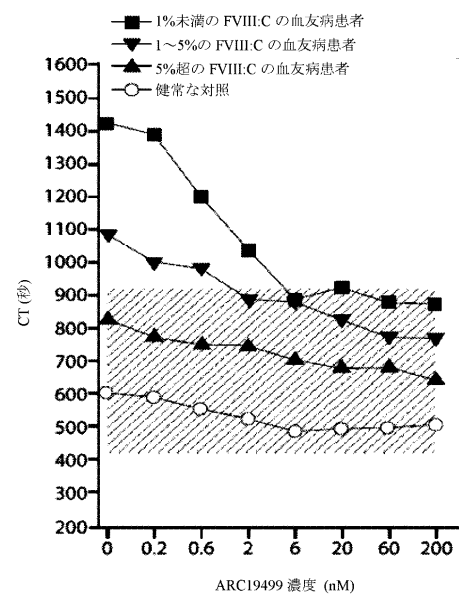
【図 8 3】

【図 8 3】



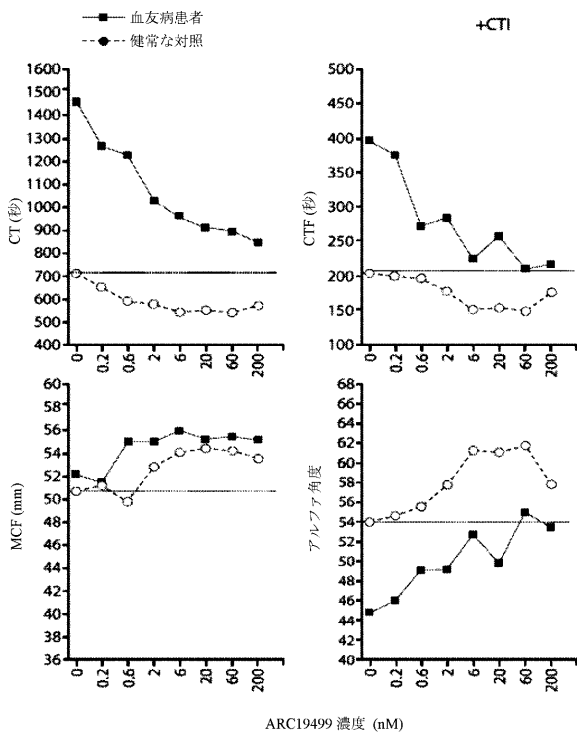
【図 8 4】

【図 8 4】



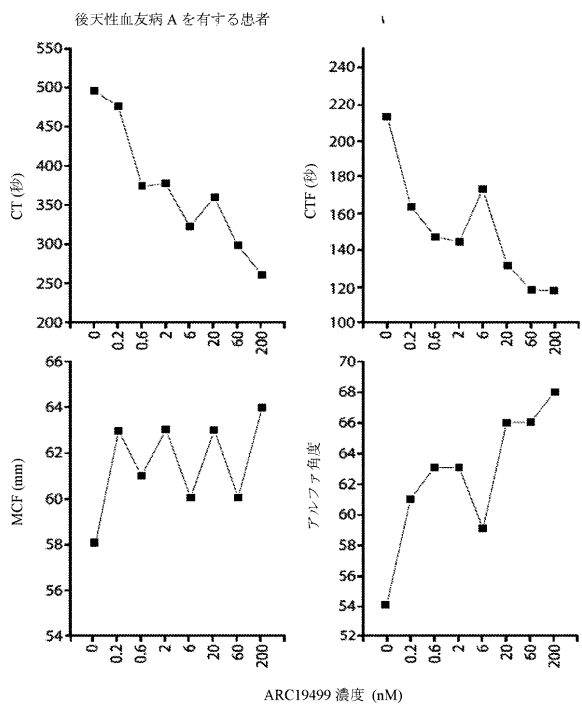
【図 8 5】

【図 8 5】



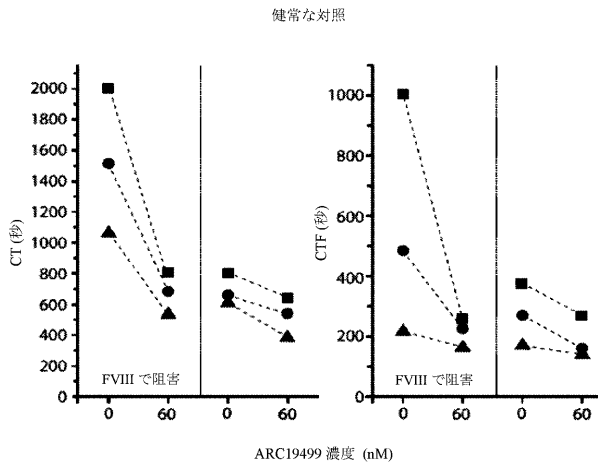
【図 8 6】

【図 8 6】



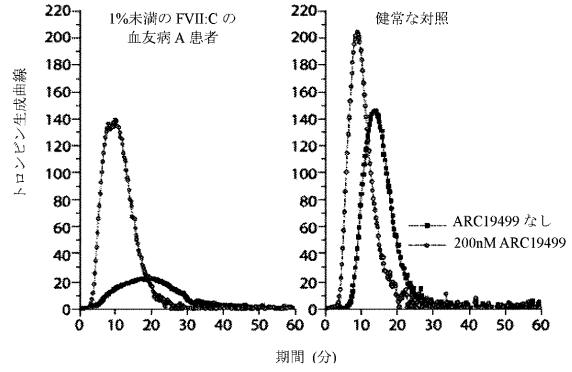
【図 87】

【図 87】



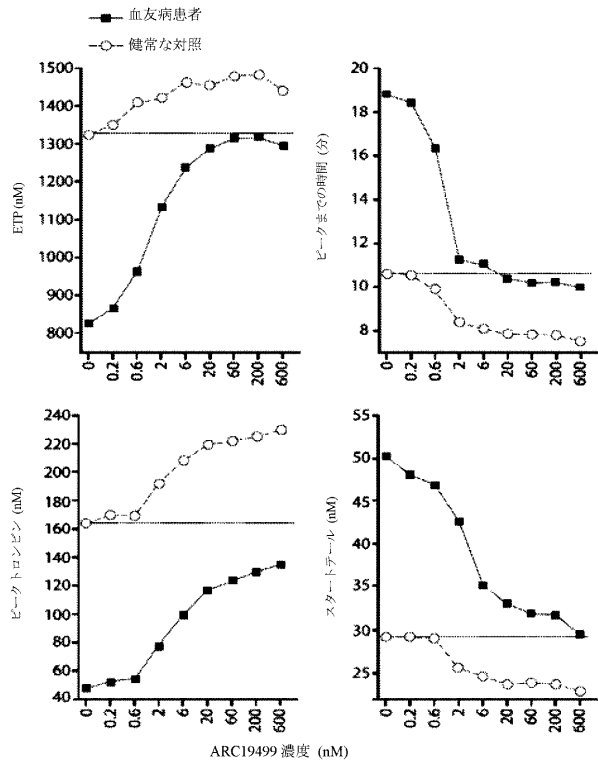
【図 88】

【図 88】



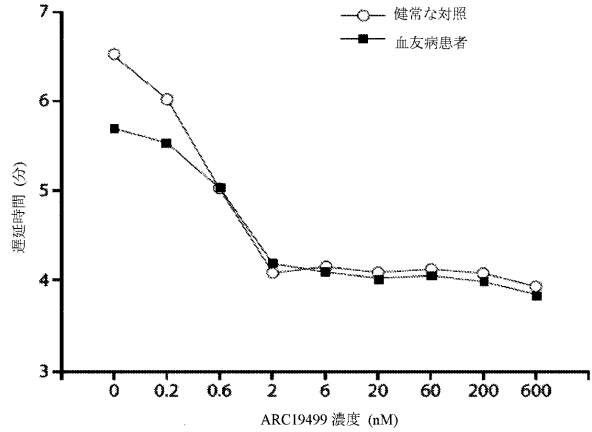
【図 89】

【図 89】



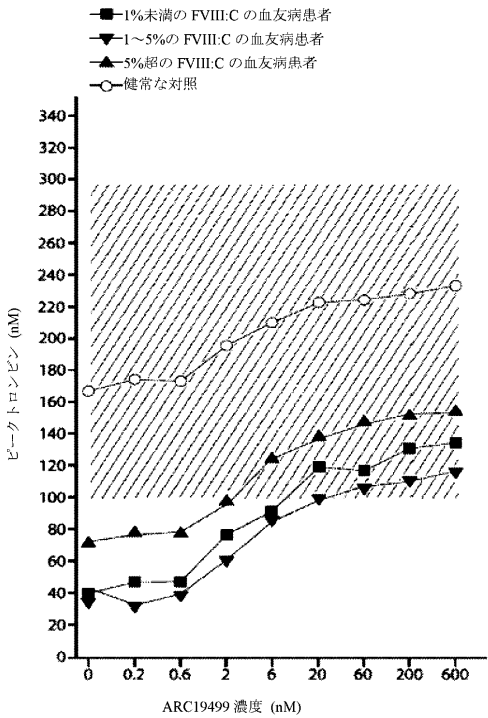
【図 90】

【図 90】



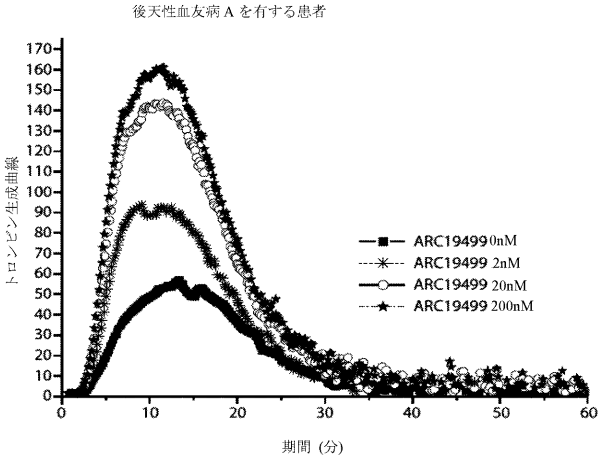
【 図 9 1 】

【 図 9 1 】



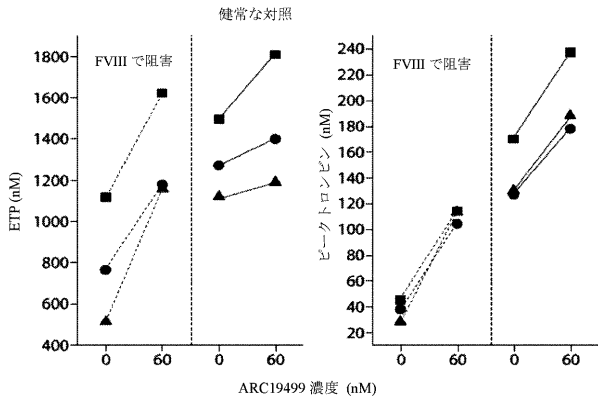
【 図 9 2 】

【 図 9 2 】



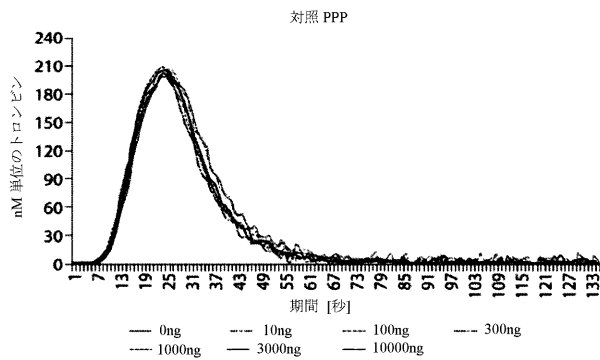
【 図 9 3 】

【 図 9 3 】



【 図 9 4 】

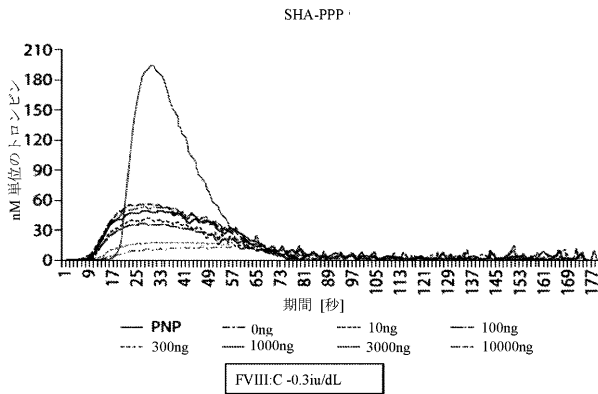
【 図 9 4 】



19499 濃度 ng/mL	ETP[nM 単位の トロンビン、分] 1341-2171	ピーク[nM 単位のトロン ビン]1176-256
	1607.5	193.50
10000	1500.5	202.10
3000	1537.5	206.02
1000	1521.5	208.69
300	1448.5	203.53
100	1497.5	207.64
10	1640.0	208.28
0	1601.5	203.57

【図 9 5】

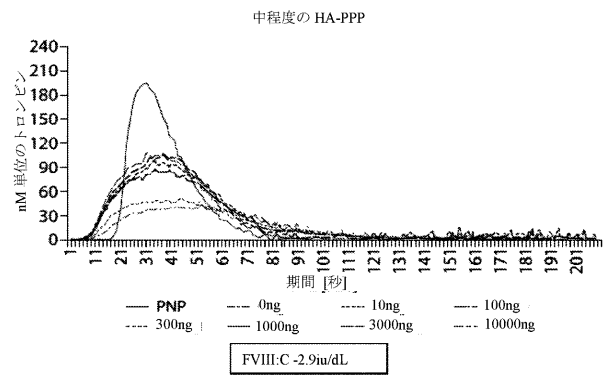
【図 9 5】



19499 濃度 ng/mL	ETP[nM 単位の トロンビン、分] 1341-2171	ピーク[nM 単位のトロン ビン]176-256
	1607.5	193.50
10000	818.5	56.60
3000	815.0	53.69
1000	799.0	49.46
300	631.0	41.08
100	570.0	36.33
10	356.5	17.94
0	300.5	14.25

【図 9 6】

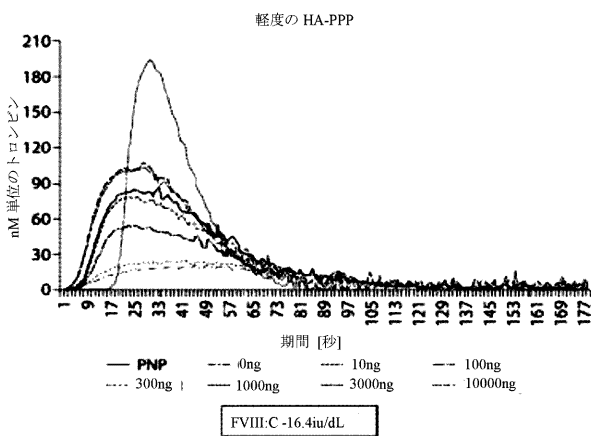
【図 9 6】



19499 濃度 ng/mL	ETP[nM 単位の トロンビン、分] 1341-2171	ピーク[nM 単位のトロン ビン]176-256
	1607.5	193.50
10000	1531.0	105.60
3000	1520.0	103.29
1000	1495.0	96.64
300	1492.5	94.66
100	1369.5	85.21
10	1013.5	48.64
0	954.0	40.62

【図 9 7】

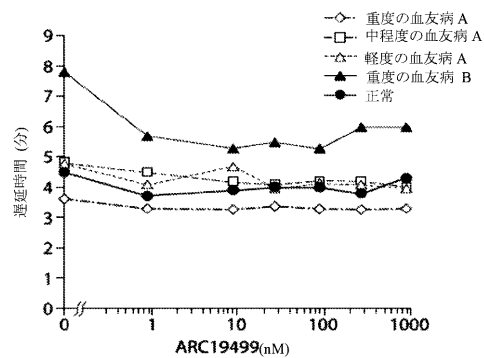
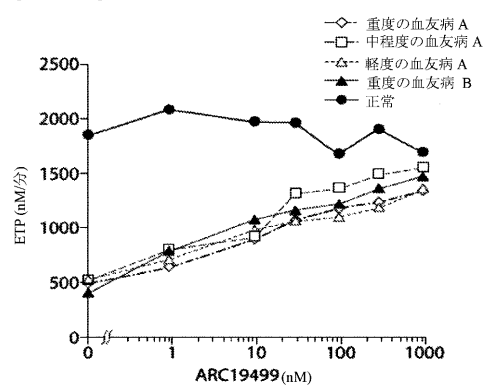
【図 9 7】



19499 濃度 ng/mL	ETP[nM 単位の トロンビン、分] 1341-2171	ピーク[nM 単位のトロン ビン]176-256
	1607.5	193.50
10000	1648.0	84.02
3000	1427.0	81.26
1000	1396.0	73.46
300	1136.0	66.43
100	1052.0	49.53
10	692.8	30.04
0	457.5	19.22

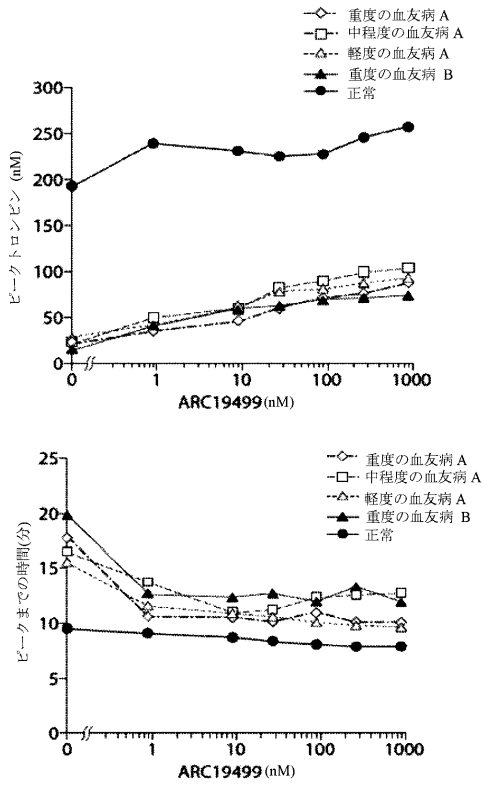
【図 9 8 - 1】

【図 9 8 - 1】



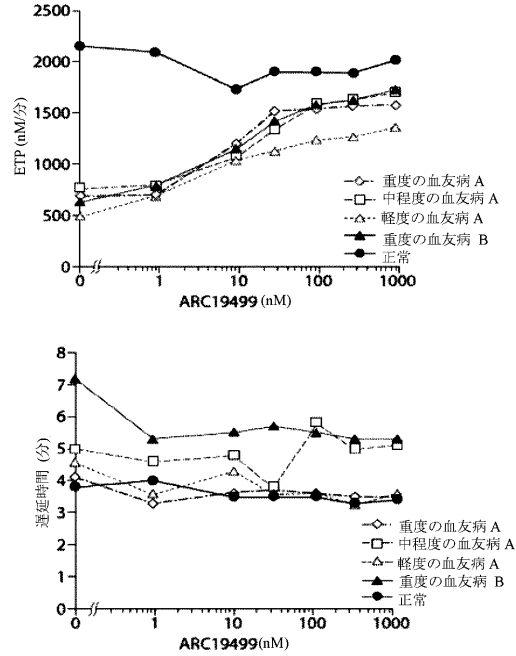
【図 98-2】

【図 98-2】



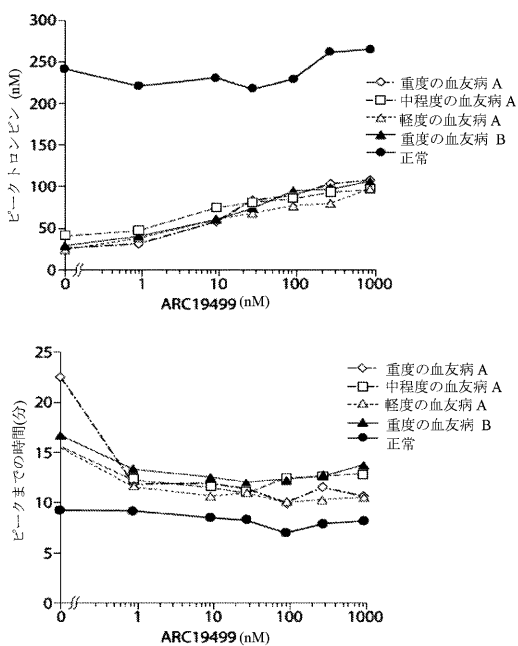
【図 99-1】

【図 99-1】



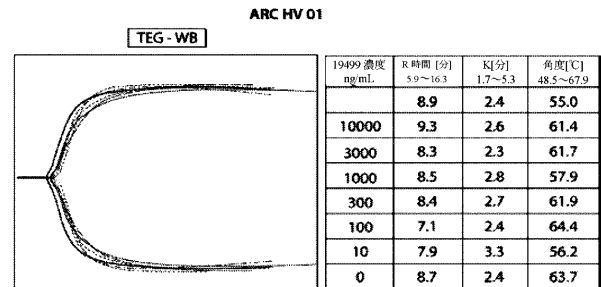
【図 99-2】

【図 99-2】



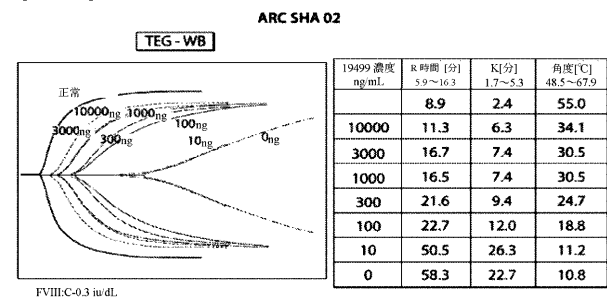
【図 100】

【図 100】



【図 101】

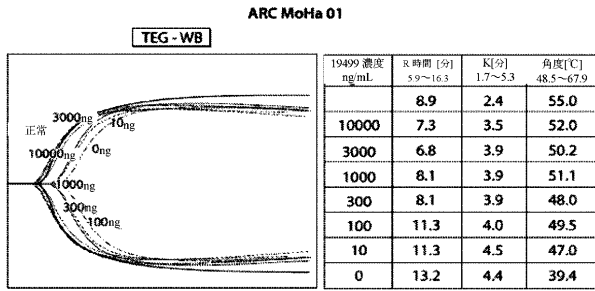
【図 101】



FVIII:C-0.3 iu/dL

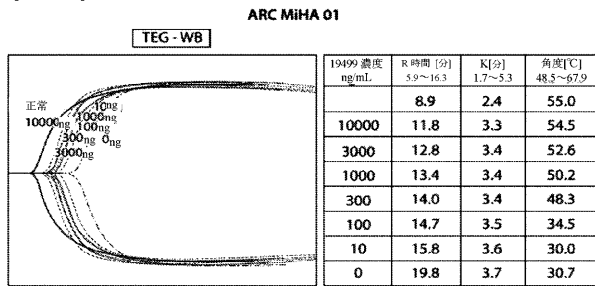
【図 102】

【図 102】



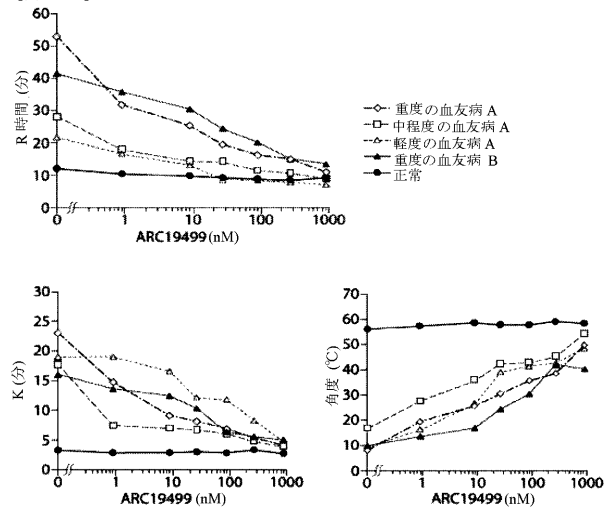
【図 103】

【図 103】



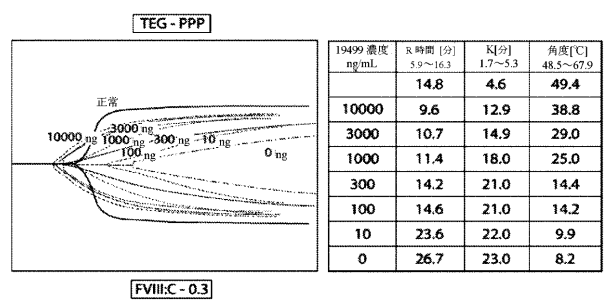
【図 104】

【図 104】



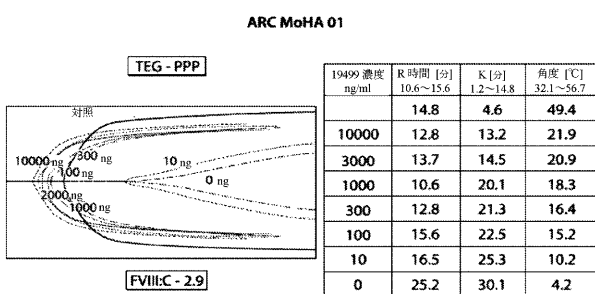
【図 105】

【図 105】



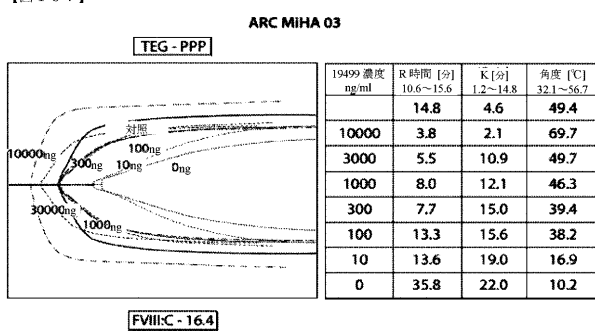
【図 106】

【図 106】



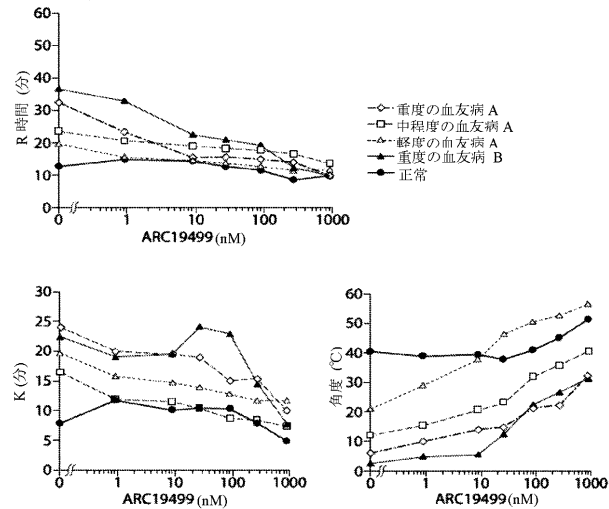
【図 107】

【図 107】

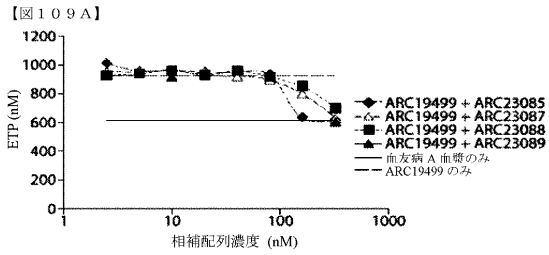


【図 108】

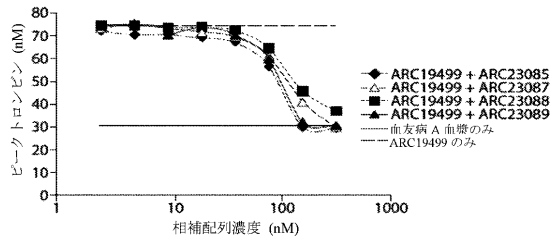
【図 108】



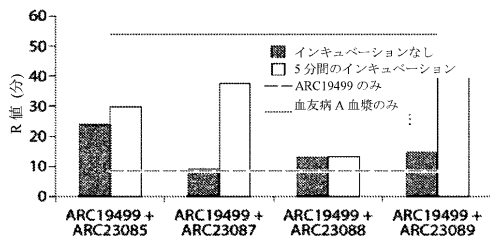
【図 109】



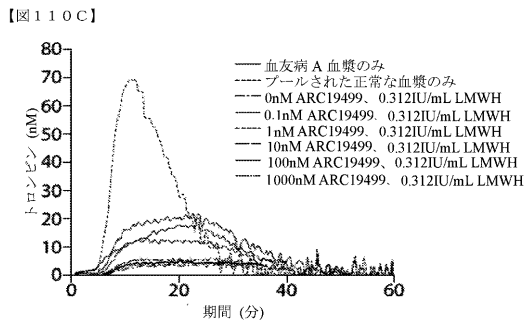
【図 109 B】



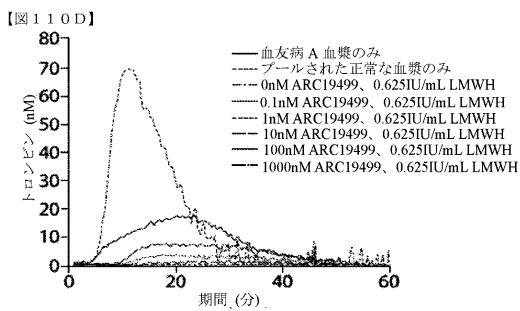
【図 109 C】



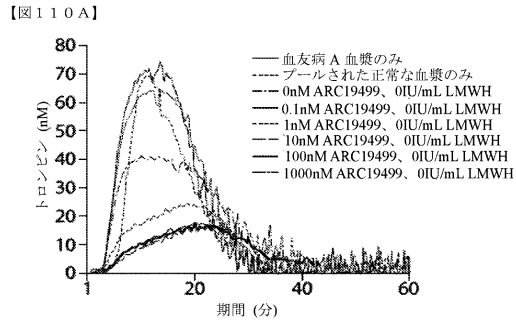
【図 110 C】



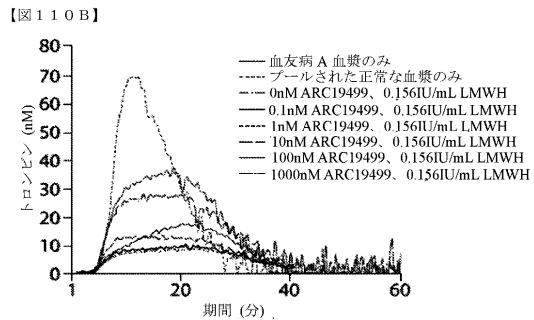
【図 110 D】



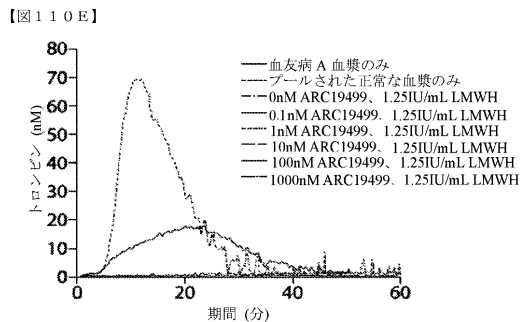
【図 110 A】



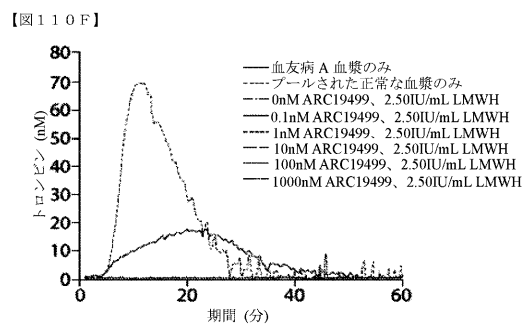
【図 110 B】



【図 110 E】

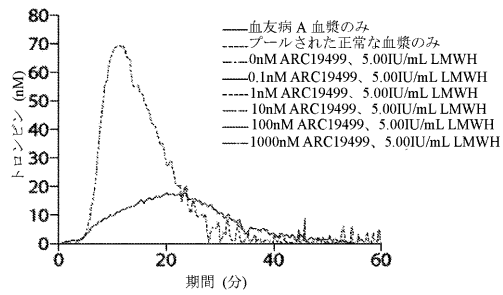


【図 110 F】



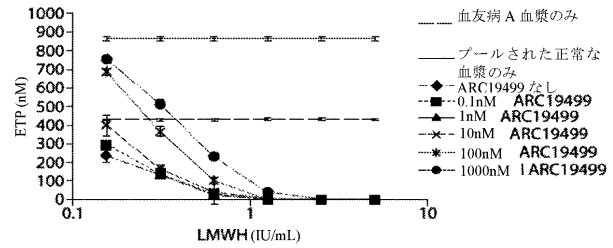
【図 1 1 0 G】

【図 1 1 0 G】

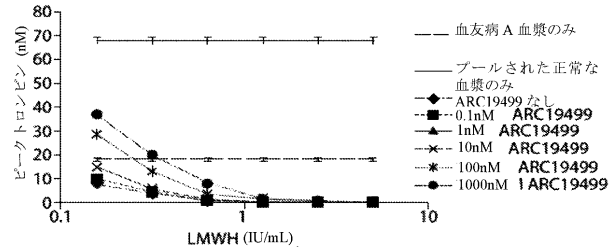


【図 1 1 1】

【図 1 1 1 A】

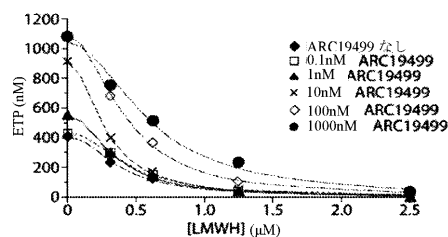


【図 1 1 1 B】



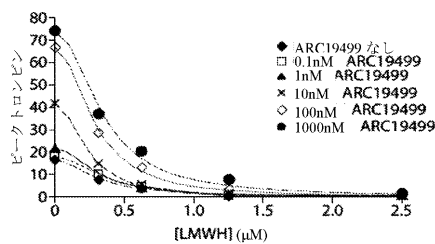
【図 1 1 2】

【図 1 1 2 A】



[ARC19499] nM	LMWH IC ₅₀			
	ETP		ピーク thrombin	
	IC ₅₀ (nM)	標準誤差	IC ₅₀ (nM)	標準誤差
0	381	24.3	299	18.0
0.1	449	13.3	353	13.6
1.0	345	9.4	290	8.2
10	274	7.7	226	5.9
100	418	16.5	268	5.9
1000	561	36.2	318	10.6

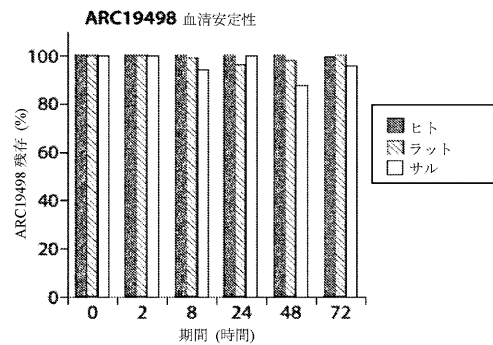
【図 1 1 2 B】



[ARC19499] nM	LMWH IC ₅₀			
	ETP		ピーク thrombin	
	IC ₅₀ (nM)	標準誤差	IC ₅₀ (nM)	標準誤差
0	381	24.3	299	18.0
0.1	449	13.3	353	13.6
1.0	345	9.4	290	8.2
10	274	7.7	226	5.9
100	418	16.5	268	5.9
1000	561	36.2	318	10.6

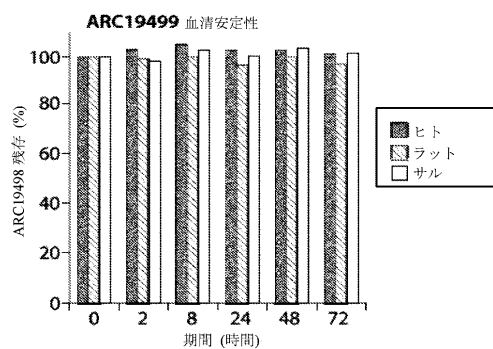
【図 1 1 3 A】

【図 1 1 3 A】



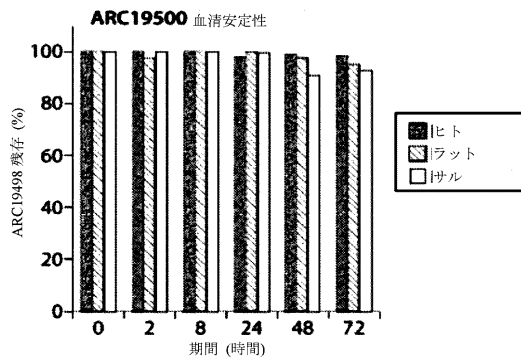
【図 1 1 3 B】

【図 1 1 3 B】



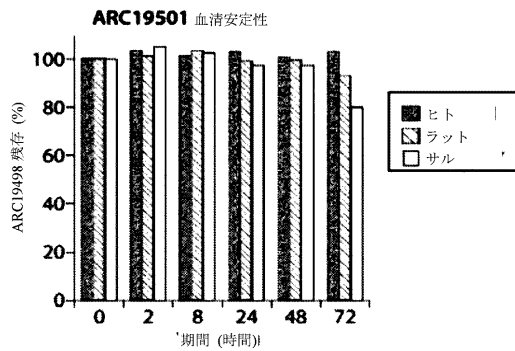
【図 1 1 3 C】

【図 1 1 3 C】



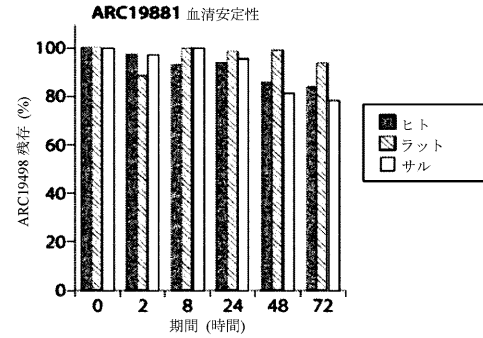
【図 1 1 3 D】

【図 1 1 3 D】



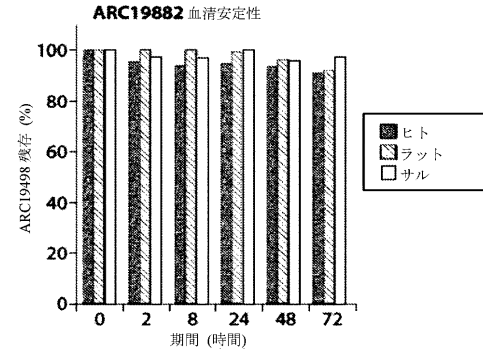
【図 1 1 3 E】

【図 1 1 3 E】



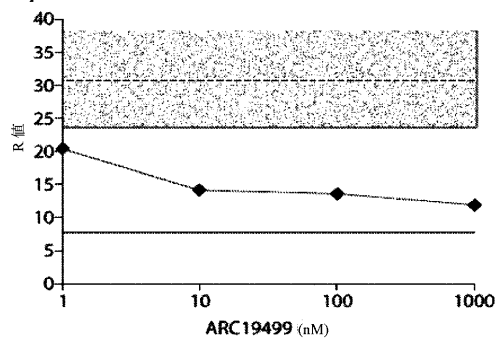
【図 1 1 3 F】

【図 1 1 3 F】



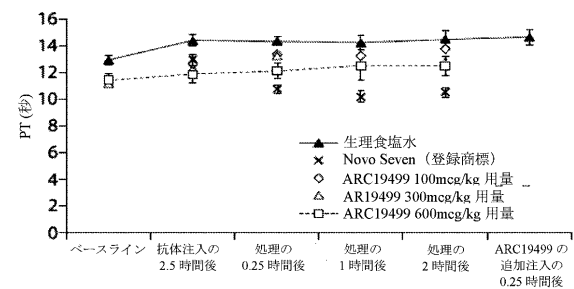
【図 1 1 4】

【図 1 1 4】



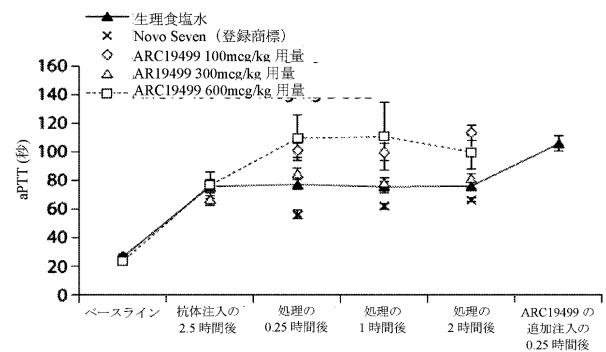
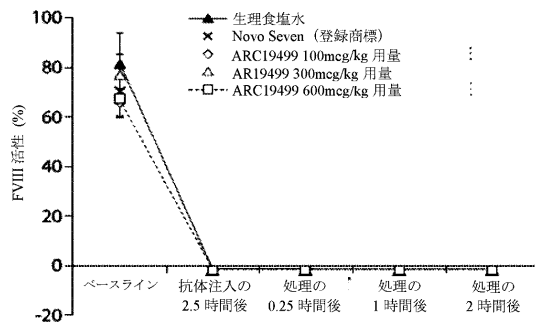
【図 1 1 6】

【図 1 1 6】



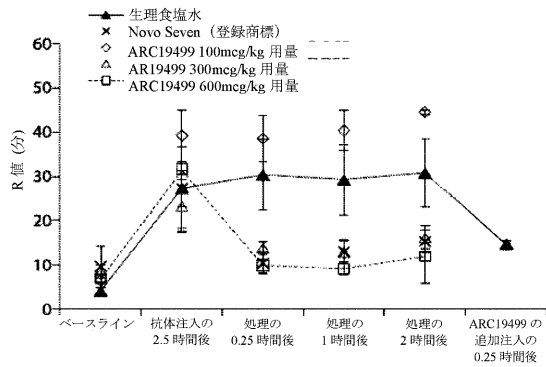
【図 1 1 5】

【図 1 1 5】



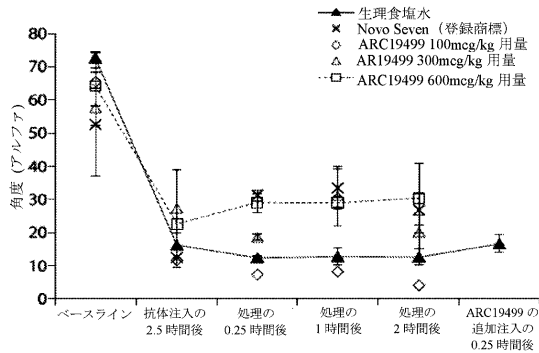
【図 1 1 7 A】

【図 1 1 7 A】



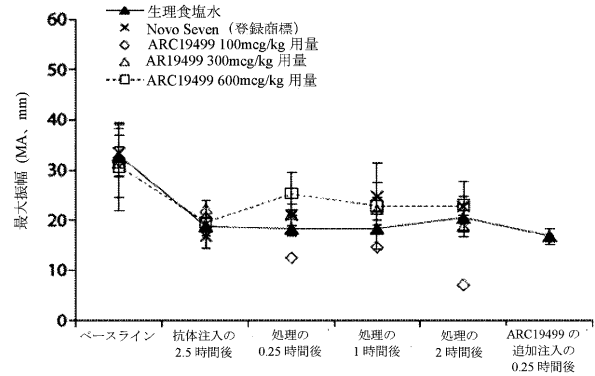
【図 1 1 7 B】

【図 1 1 7 B】



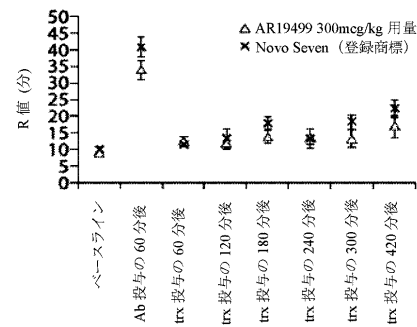
【図 1 1 7 C】

【図 1 1 7 C】



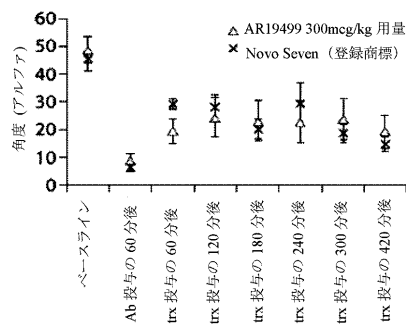
【図 1 1 8 A】

【図 1 1 8 A】



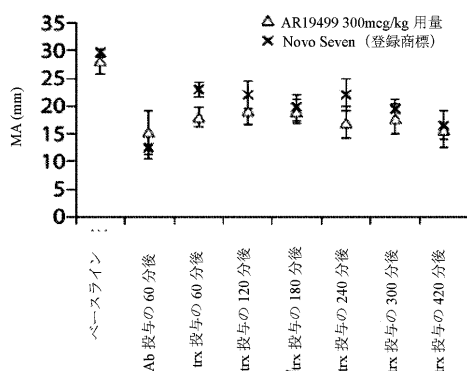
【図 1 1 8 B】

【図 1 1 8 B】



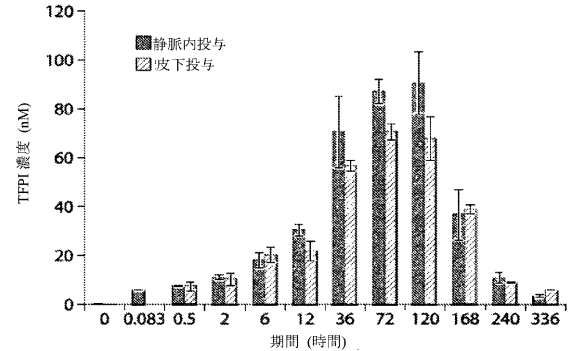
【図 1 1 8 C】

【図 1 1 8 C】



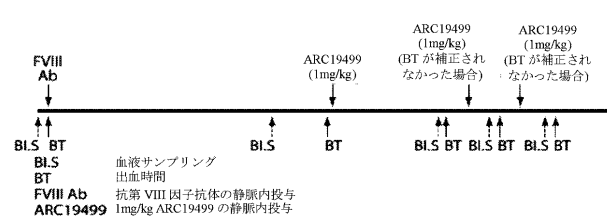
【図 1 1 9】

【図 1 1 9】



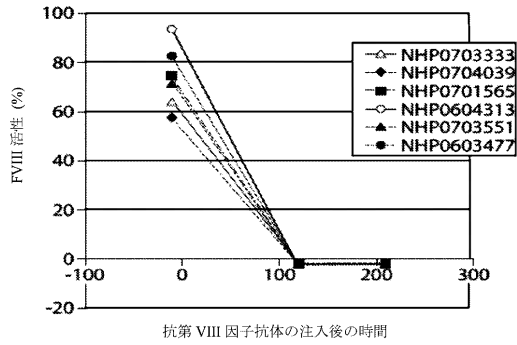
【図 1 2 0】

【図 1 2 0】



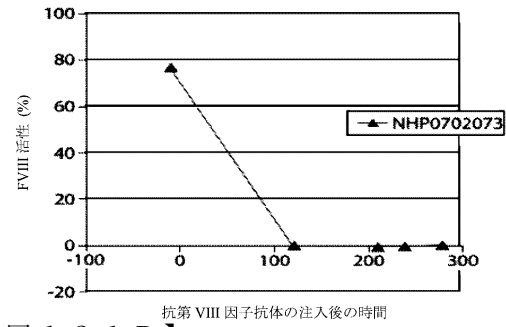
【図 1 2 1 A】

【図 1 2 1 A】



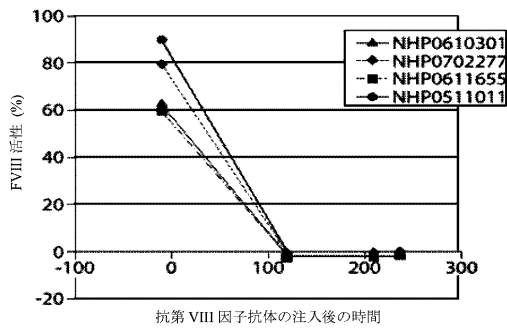
【図 1 2 1 C】

【図 1 2 1 C】



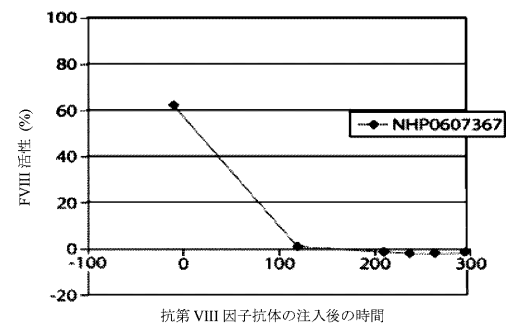
【図 1 2 1 B】

【図 1 2 1 B】



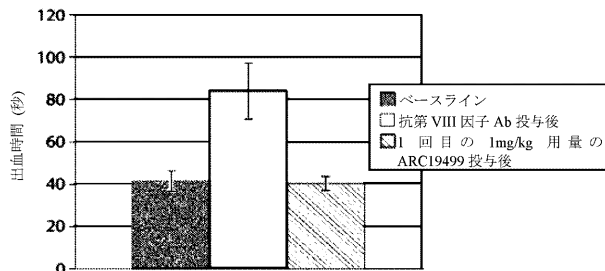
【図 1 2 1 D】

【図 1 2 1 D】



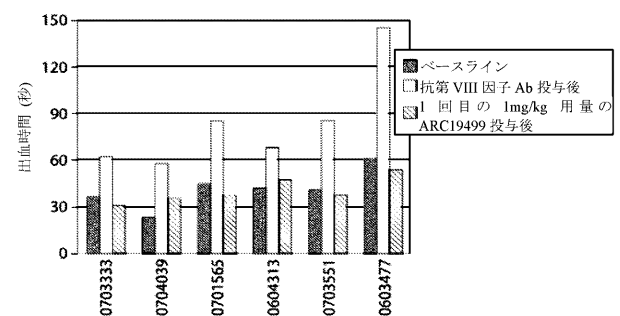
【図 1 2 2】

【図 1 2 2 A】

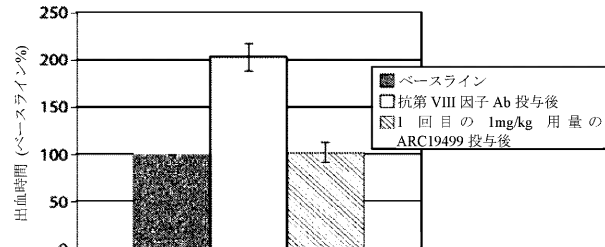


【図 1 2 3】

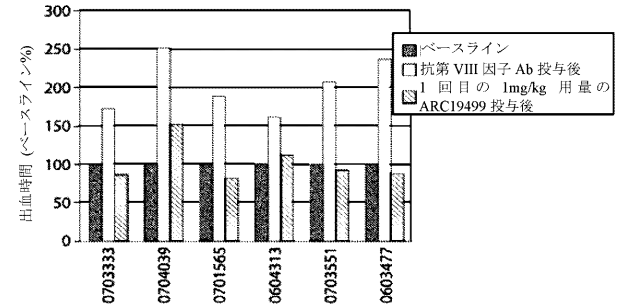
【図 1 2 3 A】



【図 1 2 2 B】

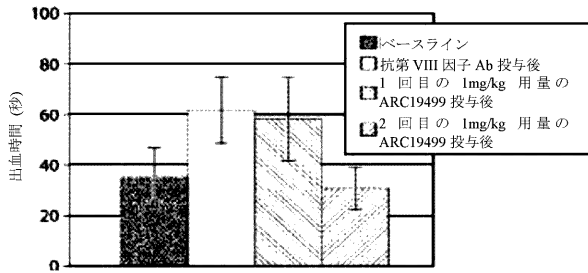


【図 1 2 3 B】

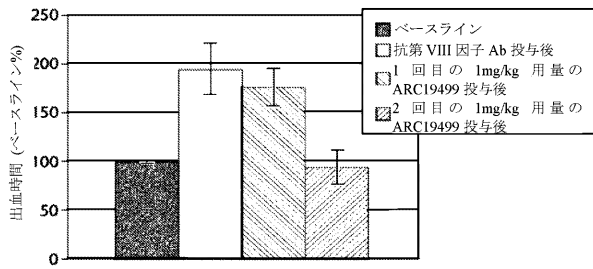


【図 1 2 4】

【図 1 2 4 A】

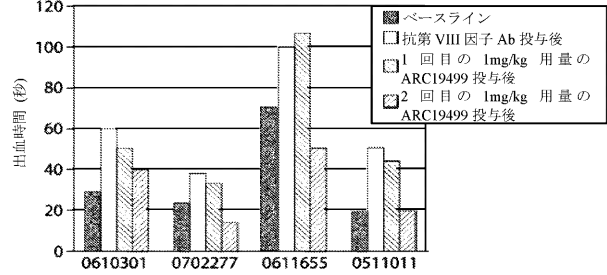


【図 1 2 4 B】

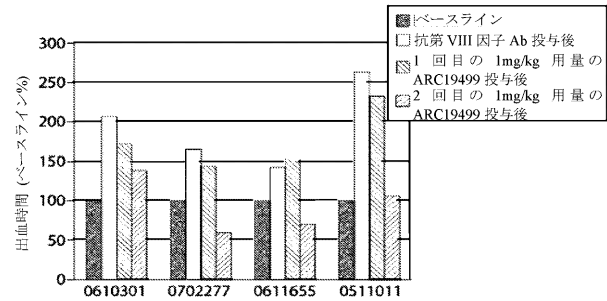


【図 1 2 5】

【図 1 2 5 A】

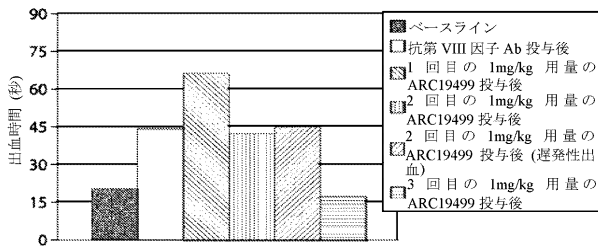


【図 1 2 5 B】

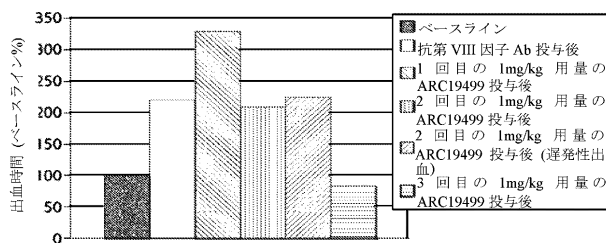


【図 1 2 6】

【図 1 2 6 A】

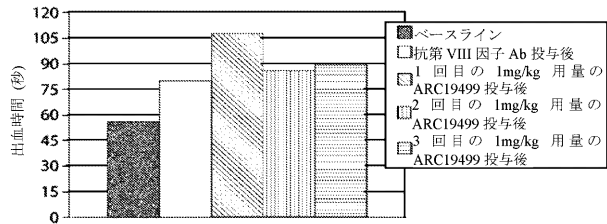


【図 1 2 6 B】

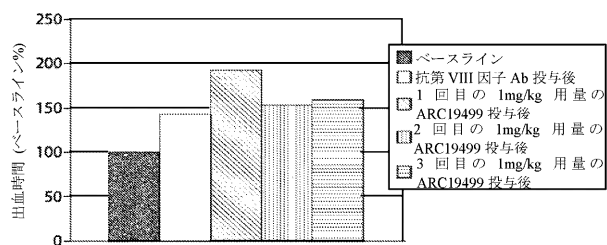


【図 1 2 7】

【図 1 2 7 A】

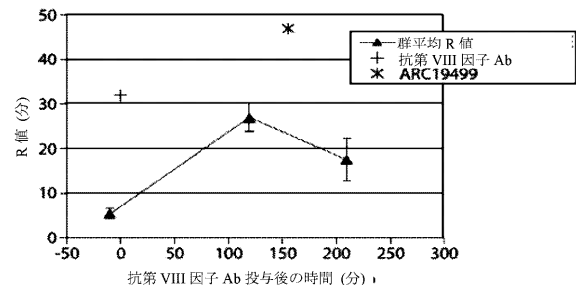


【図 1 2 7 B】



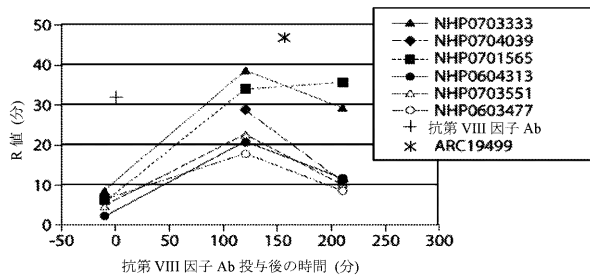
【図 1 2 8】

【図 1 2 8】



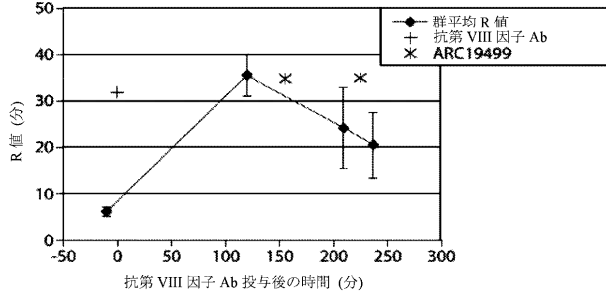
【図 1 2 9】

【図 1 2 9】



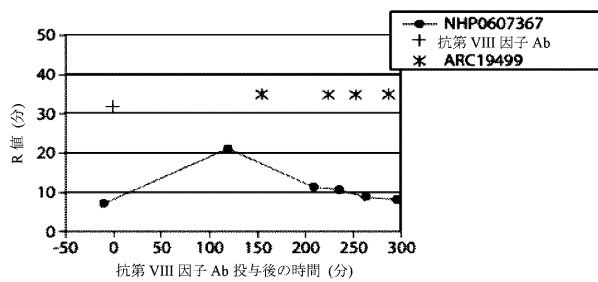
【図 1 3 0】

【図 1 3 0】



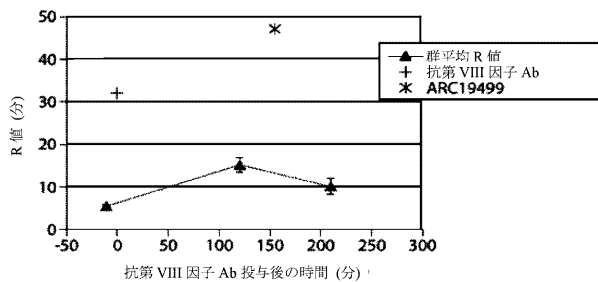
【図 1 3 3】

【図 1 3 3】



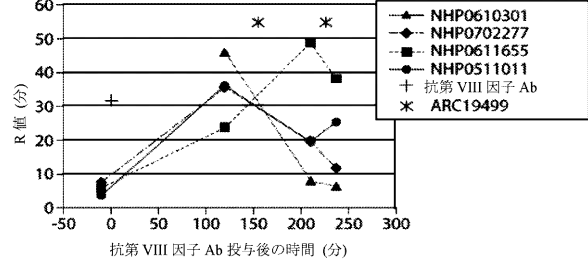
【図 1 3 4】

【図 1 3 4】



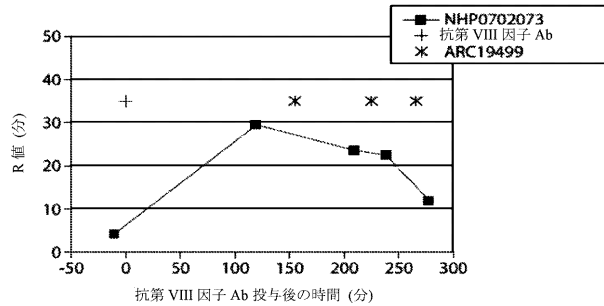
【図 1 3 1】

【図 1 3 1】



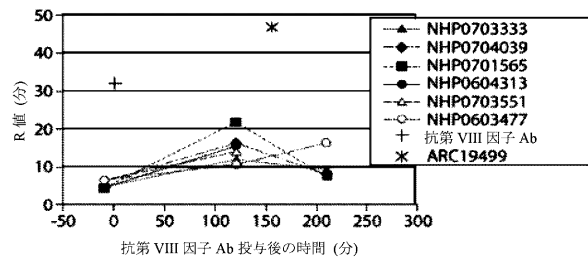
【図 1 3 2】

【図 1 3 2】



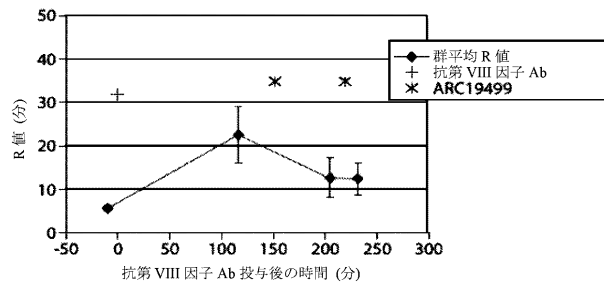
【図 1 3 5】

【図 1 3 5】



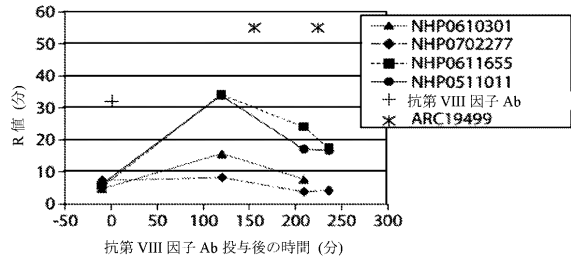
【図 1 3 6】

【図 1 3 6】



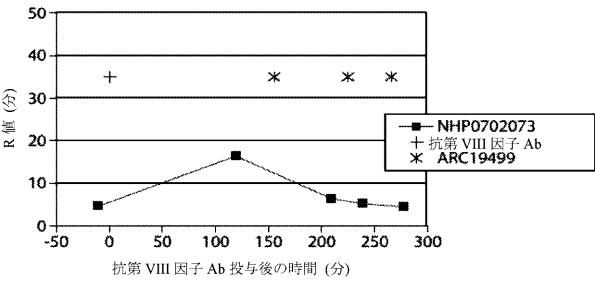
【図 1 3 7】

【図 1 3 7】



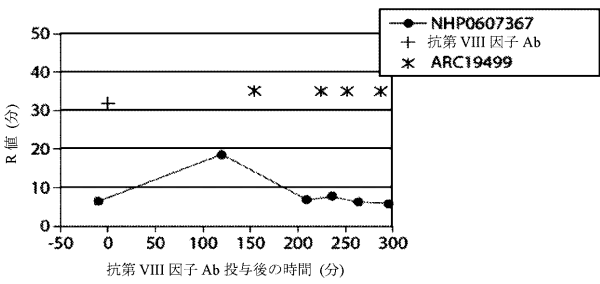
【図 1 3 8】

【図 1 3 8】



【図 1 3 9】

【図 1 3 9】



【図 1 4 0 - 1】

Figure 140-1 is a table showing the R value (分) for various NHP and ARC samples. The table has 45 rows and 31 columns. The legend indicates: NHP0702073 (solid line with squares), 抗第 VIII 因子 Ab (plus sign), and ARC19499 (asterisk). The R value for NHP0702073 peaks at approximately 15 minutes around 100 minutes. The R value for 抗第 VIII 因子 Ab is approximately 30 minutes. The R value for ARC19499 is approximately 35 minutes.

【図 1 4 0 - 2】

Figure 140-2 is a table showing the R value (分) for various NHP and ARC samples. The table has 45 rows and 31 columns. The legend indicates: NHP0702073 (solid line with squares), 抗第 VIII 因子 Ab (plus sign), and ARC19499 (asterisk). The R value for NHP0702073 peaks at approximately 15 minutes around 100 minutes. The R value for 抗第 VIII 因子 Ab is approximately 30 minutes. The R value for ARC19499 is approximately 35 minutes.

【 図 1 4 1 - 1 】

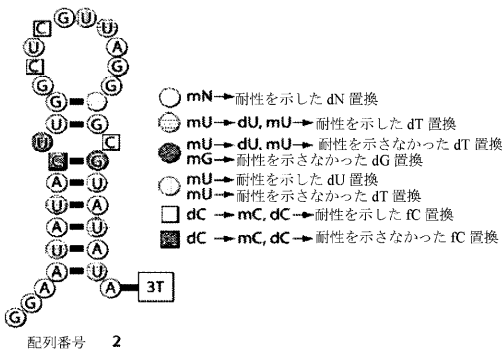
[illegible]

【図 1 4 1 - 2】

[illegible]

【図 1 4 2】

【例 142A】



【図 1 4 2 B】

配列番号		残基 9	残基 14	残基 16	残基 25	耐性を示した
2	ARC17480	dC	dC	dC	dC	示した
66	ARC18545	dC	mC	mC	dC	示した
8	ARC18546	dC	mC	dC	mC	示した
67	ARC18549	dC	mC	mC	mC	示した
68	ARC19476	fC	dC	dC	dC	示した
69	ARC19477	dC	mC	fC	dC	示した
70	ARC19478	dC	mC	dC	fC	示した
71	ARC19484	dC	fC	dC	mC	示した
72	ARC19490	fC	mC	dC	mC	示した
73	ARC19491	dC	mC	fC	mC	示した

【図 1 4 3 - 1】

[illegible]

【图143-1】

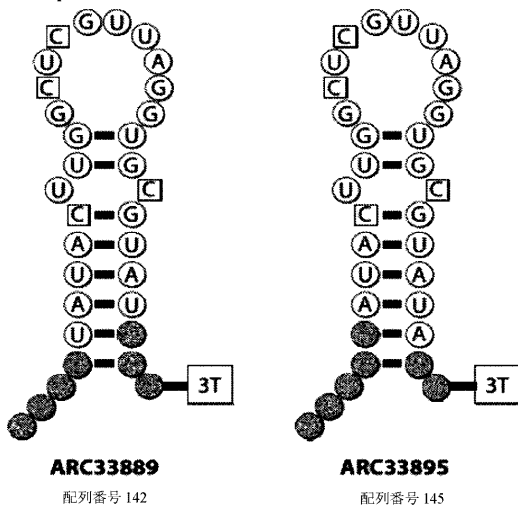
【図 1 4 3 - 2】

配列番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
133	JAC33144	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
134	JAC33145	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
135	JAC33146	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
136	JAC33147	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
137	JAC33148	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
138	JAC33149	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
139	JAC33150	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
140	JAC33151	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
141	JAC33152	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
142	JAC33153	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
143	JAC33154	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
144	JAC33155	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
145	JAC33156	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
146	JAC33157	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T
147	JAC33158	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	3T

【図 1 4 3 - 2】

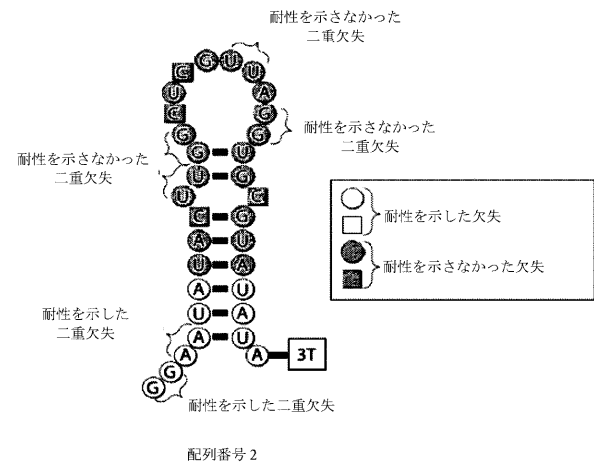
【図 1 4 4 B】

【図 1 4 4 B】



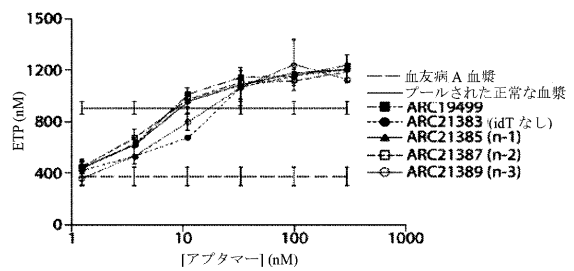
【図 1 4 4 A】

【図 1 4 4 A】

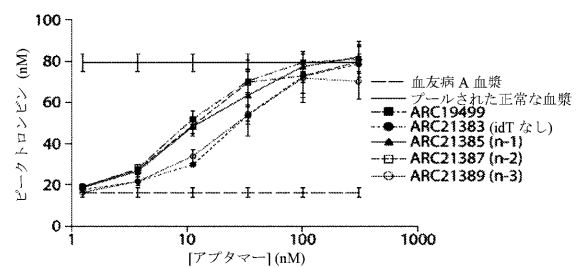


【図 1 4 5】

【図 1 4 5 A】



【図 1 4 5 B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/45797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00 (2010.01) USPC - 514/44R 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) IPC(8): A61K 48/00 (2010.01) USPC: 514/44R 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) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), PubMed, Google Scholar: human tissue factor pathway inhibitor, TFPI, aptamer\$2, inhibit\$4, thrombin, hemophilia, antibody\$4, AD4903, factor Xa, bleeding disorder, coagulation, hemophilia, treatment, TFPI aptamer, tissue factor pathway inhibitor aptamer, competitive binding, antibody																													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 7,250,496 B2 (BENTWICH) 31 July 2007 (31.07.2007); col 2, ln 48-58; col 271, ln 8-16</td> <td>26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,410,278 B1 (NOTOMI et al.) 25 June 2002 (25.06.2002); abstract; col 12, ln 53-57</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BATES et al., The status of new anticoagulants, British Journal of Haematology, July 2006, Vol. 134, No. 1, pages 3-19; page 5, col 1, para 3-col 2, para 1</td> <td>31-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BROZE, Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. Annual Review of Medicine, February 1995, Vol. 46, pages 103-112, abstract</td> <td>31-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,981,471 A (PAPATHASSIU et al.) 09 November 1999 (09.11.1999); col 5, ln 50-51; SEQ ID NO:1</td> <td>31-32</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ECKER et al., GenBank: BH755568.1, 01 March 2002 [online]. [Retrieved on 2010-12-01]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/BH755568></td> <td>1-3, 22-25, 34, 36, 37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PRASAD et al., Efficacy and safety of a new-class hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A, Blood, 31 October 2007, Vol. 111, pages 672-679; abstract</td> <td>33, 35</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 7,250,496 B2 (BENTWICH) 31 July 2007 (31.07.2007); col 2, ln 48-58; col 271, ln 8-16	26	Y		29	Y	US 6,410,278 B1 (NOTOMI et al.) 25 June 2002 (25.06.2002); abstract; col 12, ln 53-57	29	Y	BATES et al., The status of new anticoagulants, British Journal of Haematology, July 2006, Vol. 134, No. 1, pages 3-19; page 5, col 1, para 3-col 2, para 1	31-32	Y	BROZE, Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. Annual Review of Medicine, February 1995, Vol. 46, pages 103-112, abstract	31-32	Y	US 5,981,471 A (PAPATHASSIU et al.) 09 November 1999 (09.11.1999); col 5, ln 50-51; SEQ ID NO:1	31-32	A	ECKER et al., GenBank: BH755568.1, 01 March 2002 [online]. [Retrieved on 2010-12-01]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/BH755568>	1-3, 22-25, 34, 36, 37	A	PRASAD et al., Efficacy and safety of a new-class hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A, Blood, 31 October 2007, Vol. 111, pages 672-679; abstract	33, 35
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																											
X	US 7,250,496 B2 (BENTWICH) 31 July 2007 (31.07.2007); col 2, ln 48-58; col 271, ln 8-16	26																											
Y		29																											
Y	US 6,410,278 B1 (NOTOMI et al.) 25 June 2002 (25.06.2002); abstract; col 12, ln 53-57	29																											
Y	BATES et al., The status of new anticoagulants, British Journal of Haematology, July 2006, Vol. 134, No. 1, pages 3-19; page 5, col 1, para 3-col 2, para 1	31-32																											
Y	BROZE, Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. Annual Review of Medicine, February 1995, Vol. 46, pages 103-112, abstract	31-32																											
Y	US 5,981,471 A (PAPATHASSIU et al.) 09 November 1999 (09.11.1999); col 5, ln 50-51; SEQ ID NO:1	31-32																											
A	ECKER et al., GenBank: BH755568.1, 01 March 2002 [online]. [Retrieved on 2010-12-01]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/BH755568>	1-3, 22-25, 34, 36, 37																											
A	PRASAD et al., Efficacy and safety of a new-class hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A, Blood, 31 October 2007, Vol. 111, pages 672-679; abstract	33, 35																											
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																													
* 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 "I" 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 "&" document member of the same patent family																													
Date of the actual completion of the international search 30 November 2010 (30.11.2010)		Date of mailing of the international search report 15 DEC 2010																											
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																											

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/45797

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/45797

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-21, 27, 28, and 30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/367,766

(32)優先日 平成22年7月26日(2010.7.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(71)出願人 501453189

バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・アノニム

BAXTER HEALTHCARE S. A.

スイス国 8152 グラットパーク (オプフィコン), サーガウアーシュトラッセ 130

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 シャウブ, ロバート ジー.

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03076, ペラム, ジェレミー ヒル ロード 118

(72)発明者 マクギネス, キャスリーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, ウェンデル ストリート 12, ナンバー7

(72)発明者 ネルソン, ジェニファー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02115, ボストン, マールボロー ストリート 428, ナンバー4

(72)発明者 ゲンガ, ライアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02143, サマービル, ハイランド アベニュー 270, アpartment 43

(72)発明者 ウォーターズ, エミリー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02130, ジャマイカ プレイン, ボイントン ストリート 35, ユニット 1

(72)発明者 クルス, ジェフリー シー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01890, ウィンチェスター, ウォーター ストリート 41

(72)発明者 ディーナー, ジョン エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ブリストル ストリート 87, ユニット 1ビー

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA20 GA11 HA17

4C084 AA19 MA02 NA05 ZA532

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA53 ZC41