



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112156176 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(21) 申请号 202011260045.4

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2015.01.15

A61K 38/48 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 9/00 (2006.01)

61/931,071 2014.01.24 US

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 9/10 (2006.01)

201580005696.X 2015.01.15

(71) 申请人 辉瑞公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 S·阿金 J·弗鲁比斯

M·E·卡尔 S·赫特 R·贾舒亚

D·D·彼德曼

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

权利要求书4页 说明书21页

序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

治疗脑内出血的组合物和方法

(57) 摘要

本公开提供了通过施用FXa变体治疗或预防对象脑内出血 (ICH) 的组合物和方法。

1. 因子Xa (FXa) 变体在制备用于治疗对象脑内出血 (ICH) 的药物中的用途, 其中所述FXa变体包括选自下组的至少一个取代突变:

- (a) 与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly取代; 和
- (b) 与SEQ ID NO:1中236对应的位置处的氨基酸用Leu、Ala或Gly取代。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Leu取代。

3. FXa变体在制备用于降低具有ICH的对象死亡可能性的药物中的用途, 其中所述FXa变体包括选自下组的至少一个取代突变:

- (a) 与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly取代; 和
- (b) 与SEQ ID NO:1中236对应的位置处的氨基酸用Leu、Ala或Gly取代。

4. 如权利要求3所述的用途, 其中所述与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Leu取代。

5. FXa变体在制备用于提高具有ICH的对象的脑功能的药物中的用途, 其中所述FXa变体包括选自下组的至少一个取代突变:

- (a) 与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly取代; 和
- (b) 与SEQ ID NO:1中236对应的位置处的氨基酸用Leu、Ala或Gly取代。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中所述与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Leu取代。

7. 如权利要求5所述的用途, 其中所述脑功能提高与降低ICH所导致的增高的颅内压 (ICP) 相关, 所述ICP降低到等于或低于选自80mm Hg、70mm Hg、60mm Hg、50mm Hg、40mm Hg、30mm Hg、20mm Hg和10mmHg的压力值。

8. 如权利要求5所述的用途, 其中所述脑功能提高与维持脑灌注压 (CPP) 相关, 所述CPP维持在等于或高于选自40mm Hg、50mm Hg、60mmHg、70mm Hg、80mm Hg、90mm Hg、100mm Hg、110、mm Hg和120mmHg的压力值。

9. 如权利要求5所述的用途, 其中所述脑功能提高与维持脑组织氧分压 (PbtO₂) 相关, 所述PbtO₂维持在等于或高于选自6mm Hg、8mm Hg、10mm Hg、12mm Hg、14mm Hg、16mm Hg、18mm Hg、20、mm Hg、22mm Hg和24mm Hg的压力值。

10. 如权利要求5所述的用途, 其中所述脑功能提高与降低乳酸和丙酮酸浓度之比 (LAR) 相关, 所述LAR降低到等于或低于选自60、50、40、30和20的值。

11. 如权利要求5所述的用途, 其中所述脑功能提高与降低脑血管压力反应指数 (PR_x) 的比例相关, 所述脑血管PR_x的比例降低到等于或低于选自0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.0、-0.1、-0.2和-0.3的值。

12. FXa变体在制备用于减少具有ICH的对象神经功能缺损的药物中的用途, 其中所述FXa变体包括选自下组的至少一个取代突变:

- (a) 与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly取代; 和
- (b) 与SEQ ID NO:1中236对应的位置处的氨基酸用Leu、Ala或Gly取代。

13. 如权利要求12所述的用途, 其中所述与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Leu取代。

14. 如权利要求12所述的用途, 其中所述神经功能缺损用格拉斯哥昏迷评分评价, 且其

中作为治疗结果,对象的得分从3提高到4或更高,从4提高到5或更高,从5提高到6或更高,从6提高到7或更高,从7提高到8或更高,从8提高到9或更高,从9提高到10或更高,从10提高到11或更高,从11提高到12或更高,从12提高到13或更高,从13提高到14或更高,或从14提高到15。

15. 如权利要求12所述的用途,其中所述神经功能缺损用格拉斯哥预后评分扩展版评价,且其中作为治疗结果,所治疗对象的平均得分提高到1或更佳,2或更佳,3或更佳,4或更佳,5或更佳,6或更佳,7或更佳,或8。

16. 如权利要求12所述的用途,其中所述神经功能缺损用巴氏量表评价,且其中作为治疗结果,所治疗对象的平均得分提高到10或更佳,20或更佳,30或更佳,40或更佳,50或更佳,60或更佳,70或更佳,或80或更佳,或90或更佳。

17. 如权利要求12所述的用途,其中所述神经功能缺损用NIH卒中量表评价,且其中作为治疗结果,所治疗对象的平均得分从42降低到41或更少,从41降低到40或更少,从40降低到39或更少,从39降低到38或更少,从38降低到37或更少,从37降低到36或更少,从36降低到35或更少,从35降低到34或更少,从34降低到33或更少,从33降低到32或更少,从32降低到31或更少,从31降低到30或更少,从30降低到29或更少,从29降低到28或更少,从28降低到27或更少,从27降低到26或更少,从26降低到25或更少,从25降低到24或更少,从24降低到23或更少,从23降低到22或更少,从22降低到21或更少,从21降低到20或更少,从20降低到19或更少,从19降低到18或更少,从18降低到17或更少,从17降低到16或更少,从16降低到15或更少,从15降低到14或更少,从14降低到13或更少,从13降低到12或更少,从12降低到11或更少,从11降低到10或更少,从10降低到9或更少,从9降低到8或更少,从8降低到7或更少,从7降低到6或更少,从6降低到5或更少,从5降低到4或更少,从4降低到3或更少,从3降低到2或更少,从2降低到1或更少,或从1降低到0。

18. 如权利要求12所述的用途,其中所述神经功能缺损用改良的兰金量表评价,且其中作为治疗结果,所治疗对象的平均得分从约5-6降低到约4-5,从约4-5降低到约3-4,从约3-4降低到约2-3,从约2-3降低到约1-2,或从约1-2降低到约0-1。

19. 如权利要求12所述的用途,其中所述神经功能缺损用改良的兰金量表评价,且其中作为治疗结果,改良的兰金量表评分为5或6的所治疗对象比例相较于评分为0、1、2、3或4的那些降低。

20. 如权利要求12所述的用途,其中所述神经功能缺损用改良的兰金量表评价,且其中作为治疗结果,改良的兰金量表评分为4、5或6的所治疗对象比例相较于评分为0、1、2或3的那些降低。

21. FXa变体在制备用于减少具有ICH的对象出血灶周围水肿(PHE)的药物中的用途,其中所述FXa变体包括选自下组的至少一个取代突变:

- (a) 与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly取代;和
- (b) 与SEQ ID NO:1中236对应的位置处的氨基酸用Leu、Ala或Gly取代。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Leu取代。

23. 如权利要求21所述的用途,其中作为治疗结果,具有ICH的对象的平均PHE体积相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、

60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

24. 如权利要求21所述的用途,其中作为治疗结果,具有ICH的对象中PHE所导致的颅内压平均升高相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

25. FXa变体在制备用于减少或防止具有ICH的对象血肿体积增大的药物中的用途,其中所述FXa变体包括选自下组的至少一个取代突变:

(a) 与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly取代;和

(b) 与SEQ ID NO:1中236对应的位置处的氨基酸用Leu、Ala或Gly取代。

26. 如权利要求25所述的用途,其中所述与SEQ ID NO:1中235对应的位置处的氨基酸用Leu取代。

27. 如权利要求25所述的用途,其中作为治疗结果,具有ICH的对象的平均血肿体积增大相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

28. 如权利要求25所述的用途,其中作为治疗结果,具有ICH的对象的平均血肿体积增大相较于未治疗对照减少至少约1ml、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml、5ml、5.5ml、6ml、6.5ml、7ml、7.5ml、8ml、8.5ml、9ml、9.5ml、10ml、10.5ml、11ml、11.5ml、12ml、12.5ml、13ml、13.5ml、14ml、14.5ml、15ml、16ml、17ml、18ml、19ml、20ml、22ml、24ml、26ml、28ml、30ml、35ml、40ml、45ml或50ml。

29. 如权利要求25所述的用途,其中血肿体积增大3ml或更多、6ml或更多、或12.5ml或更多的具有ICH的对象的比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

30. 如权利要求25所述的用途,其中血肿体积增大15%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或更多、33%或更多的具有ICH的对象的比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

31. 如权利要求25所述的用途,其中治疗后斑点征评分为4的ICH对象的比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

32. 如权利要求25所述的用途,其中治疗后斑点征评分为3的ICH对象的比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

33. 如权利要求25所述的用途,其中治疗后斑点征评分为2的ICH对象的比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

34. 如权利要求25所述的用途,其中治疗后斑点征评分为1的ICH对象的比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

35. 如权利要求31-34中任一项所述的用途,其中所述斑点征评分在首次施用FXa变体后的一段时间测定,所述时间选自30分钟、45分钟、60分钟、75分钟、90分钟、2小时、2.5小

时、3小时、3.5小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、30小时、48小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、18天、3周和4周。

36. 如权利要求1、3、5、12、21或25所述的用途,其中所述脑内出血在选自下组的脑区域发生:大脑、额叶、顶叶、枕叶、颞叶、小脑、脑干、中脑、脑桥、髓质、脑下垂体、下丘脑、丘脑、海马体、杏仁核、屏状核和基底神经节。

治疗脑内出血的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2015年1月15日,申请号为201580005696.X,题目为“治疗脑内出血的组合物和方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2014年1月24日提交的美国临时申请号61/931,071的权益,其内容通过引用全文纳入本文。

[0004] 参考序列表

[0005] 根据37CFR§1.821与本文同步提交的序列表通过引用纳入本文,所述序列表采用计算机可读形式(CRF),通过EFS-Web提交,文件名为PC072056A_SEQLIST_ST25.txt。序列表的电子拷贝在2015年1月6日创建,文件大小为7千字节。

背景技术

[0006] 需要有效疗法以控制一系列临床病症中的出血过多,所述病症中无法通过手术干预或其它方式控制出血。涉及不可控出血的最具破坏性的临床综合征之一是脑内出血(ICH)。非创伤性ICH是出血进入脑实质,其可延伸到脑室中。全球至少10%的中风病例由ICH引起。估计美国每年受影响的个体数目范围为37,000-52,400到多至79,500(Qureshi等,N Engl J Med 344(19):1450-1460(2001);Roger等,Circulation 125:e2-220(2012)),且预期发生率随着群体年龄而增加。ICH继续与不良临床结果相关。约40-50%的患者在1个月内死亡(Qureshi;Broderick等,Stroke 38:2001-2023(2007)),且一大部分受影响个体无法在6个月中再获得功能性独立(Broderick)。因此,ICH是永久部分或完全残疾的重要原因。

[0007] 脑内出血后的血肿体积显示是ICH患者死亡率和发病率的独立预测指标(Broderick等,Stroke 24:987-993(1993))。在约26%的脑内出血患者中于基线CT扫描1小时内发生血肿体积增大(Brott等,Stroke 28:1-5(1997))且血肿扩大是死亡率和不良患者结果的另外的独立预测指标(Davis等,Neurology 66:1175-1181(2006);Delcourt等,Neurology 79:314-319(2012))。

[0008] 目前没有批准的疗法用于治疗ICH,日常管理在很大程度上是支持性的(Rincon和Mayer,Critical Care 12:237-250(2008))。例如,施用重组凝血因子VIIa可减少ICH患者中的血肿扩大,但90天时未提高的神经功能(Mayer等,NEJM 358:2127-2137(2008))。因此,为降低死亡率和改善神经功能性结果,本领域迫切需要有效疗法以在敏感患者中预防ICH和治疗ICH患者。

发明内容

[0009] 申请者如下针对此未满足的关键临床需求,提供预防和/或治疗ICH的组合物和方法,包括用于预防和/或治疗ICH的组合物。本发明的特定非限制性实施方式示于以下段落。

[0010] 根据某些实施方式,本公开提供治疗对象脑内出血(ICH)的方法,通过给对象施用治疗有效量的因子Xa(FXa)变体,其包括与SEQ ID NO:1中235或236对应的氨基酸位置处的

至少一个取代突变。还提供FXa变体,其包括与SEQ ID NO:1中235和/或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变,用于治疗对象脑内出血(ICH)。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。

[0011] 根据某些实施方式,本公开提供方法降低具有ICH的对象由于ICH导致死亡的可能性,通过给对象施用治疗有效量的因子Xa (FXa) 变体,其包括与SEQ ID NO:1中235或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。

[0012] 根据某些实施方式,本公开提供在对象患有ICH后提高对象的脑功能的方法,通过给对象施用治疗有效量的因子Xa (FXa) 变体,其包括与SEQ ID NO:1中235或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。根据一些实施方式,脑功能提高与降低对象中由ICH所导致颅内压增高相关,降低到或低于80mm Hg、70mm Hg、60mm Hg、50mm Hg、40mm Hg、30mm Hg、20mm Hg或10mm Hg压力。在其它实施方式中,脑功能提高与维持脑灌注压(CPP) 相关,维持在或高于40mm Hg、50mm Hg、60mm Hg、70mm Hg、80mm Hg、90mm Hg、100mm Hg、110、mm Hg或120mm Hg压力。在其它实施方式中,脑功能提高与维持脑组织氧分压(PbtO₂) 相关,维持在或高于6mm Hg、8mm Hg、10mm Hg、12mm Hg、14mm Hg、16mm Hg、18mm Hg、20、mm Hg、22mm Hg或24mm Hg压力。在其它实施方式中,脑功能提高与降低乳酸和丙酮酸浓度之比(LAR) 相关,降低到或低于60、50、40、30或20。在其它实施方式中,脑功能提高与降低脑血管压力反应指数(PR_x) 相关,降低到或低于0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.0、-0.1、-0.2或-0.3。

[0013] 根据某些实施方式,本公开提供在对象患有ICH后减少对象的神经功能缺损的方法,通过给对象施用治疗有效量的因子Xa (FXa) 变体,其包括与SEQ ID NO:1中235或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。根据一些实施方式,减少的神经功能缺损用格拉斯哥昏迷评分评价,并且作为治疗结果,对象的得分提高,从3到4或更高,从4到5或更高,从5到6或更高,从6到7或更高,从7到8或更高,从8到9或更高,从9到10或更高,从10到11或更高,从11到12或更高,从12到13或更高,从13到14或更高,或从14到15。在其它实施方式中,神经功能缺损用格拉斯哥预后评分扩展版评价,并且作为治疗结果,所治疗对象的平均得分提高到1或更佳,2或更佳,3或更佳,4或更佳,5或更佳,6或更佳,7或更佳,或8。在其它实施方式中,神经功能缺损用巴氏量表评价,并且作为治疗结果,所治疗对象的平均得分提高到10或更佳,20或更佳,30或更佳,40或更佳,50或更佳,60或更佳,70或更佳,或80或更佳,或90或更佳。在其它实施方式中,神经功能缺损用NIH卒中量表评价,并且作为治疗结果,所治疗对象的平均得分降低,从42到41或更少,从41到40或更少,从40到39或更少,从39到38或更少,从38到37或更少,从37到36或更少,从36到35或更少,从35到34或更少,从34到33或更少,从33到32或更少,从32到31或更少,从31到30或更少,从30到29或更少,从29到28或更少,从28到27或更少,从27到26或更少,从26到25或更少,从25到24或更少,从24到23或更少,从23到22或更

少,从22到21或更少,从21到20或更少,从20到19或更少,从19到18或更少,从18到17或更少,从17到16或更少,从16到15或更少,从15到14或更少,从14到13或更少,从13到12或更少,从12到11或更少,从11到10或更少,从10到9或更少,从9到8或更少,从8到7或更少,从7到6或更少,从6到5或更少,从5到4或更少,从4到3或更少,从3到2或更少,从2到1或更少,或从1到0。在其它实施方式中,神经功能缺损用改良的兰金量表评价,并且作为治疗结果,所治疗对象的平均得分从约5-6降低到约4-5,从约4-5降低到约3-4,从约3-4降低到约2-3,从约2-3降低到约1-2,或从约1-2降低到约0-1。在其它实施方式中,神经功能缺损用改良的兰金量表评价,并且作为治疗结果,改良的兰金量表评分为5或6的所治疗对象比例相较于评分为0、1、2、3或4的那些降低。在其它实施方式中,神经功能缺损用改良的兰金量表评价,并且作为治疗结果,改良的兰金量表评分为4、5或6的所治疗对象比例相较于评分为0、1、2或3的那些降低。

[0014] 根据某些实施方式,本公开提供在对象患有ICH后减少对象出血灶周围水肿(PHE)的方法,通过给对象施用治疗有效量的因子Xa (FXa) 变体,其包括与SEQ ID NO:1中235或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。根据某些实施方式,治疗使具有ICH的对象的平均PHE体积相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在其它实施方式中,治疗使具有ICH的对象中PHE所导致的颅内压平均增加相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0015] 根据某些实施方式,本公开提供在对象患有ICH后减少或防止对象血肿体积增大的方法,通过给对象施用治疗有效量的因子Xa (FXa) 变体,其包括与SEQ ID NO:1中235或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。根据某些实施方式,治疗使具有ICH的对象的平均血肿体积增大相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在其它实施方式中,治疗使对象的平均血肿体积增大相较于未治疗对照减少至少约1ml、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml、5ml、5.5ml、6ml、6.5ml、7ml、7.5ml、8ml、8.5ml、9ml、9.5ml、10ml、10.5ml、11ml、11.5ml、12ml、12.5ml、13ml、13.5ml、14ml、14.5ml、15ml、16ml、17ml、18ml、19ml、20ml、22ml、24ml、26ml、28ml、30ml、35ml、40ml、45ml或50ml。在其它实施方式中,治疗使血肿体积增大3ml或更多、6ml或更多,或12.5ml或更多的对象比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在其它实施方式中,治疗使血肿体积增大15%、20%、25%、30%或33%或更多的对象比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在其它实施方式中,治疗使治疗后斑点征评分为4、3、2或1的对象比例相较于未治疗对照减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在其它实施方式中,斑点征评分在首次施用FXa变体后30分钟、45分钟、60分

钟、75分钟、90分钟、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、30小时、48小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、18天、3周或4周测定。

[0016] 根据本公开的其它实施方式,提供因子Xa (FXa) 变体,其包括与SEQ ID NO:1中235和/或236对应的氨基酸位置处的至少一个取代突变,用于治疗对象脑内出血(ICH),提高具有ICH的对象的脑功能,用于减少具有ICH的对象的神经功能缺损,用于减少具有ICH的对象出血灶周围水肿(PHE),或用于减少或防止具有ICH的对象的血肿体积增大。在一些实施方式中,与235位对应的位置处的取代可以用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly。在其它实施方式中,与236位对应的位置处的取代可以用Leu、Ala或Gly。

[0017] 并且根据其它实施方式,任何先前实施方式的特征在于,脑内出血在脑的大脑、额叶、顶叶、枕叶、颞叶、小脑、脑干、中脑、脑桥、髓质、脑下垂体、下丘脑、丘脑、海马体、杏仁核、屏状核或基底神经节中发生。

[0018] 附图简要说明

[0019] 图1A显示凝血酶生成试验(TGA)结果,测试加入不同浓度活化的因子X变体FXa^{I16L}对正常人血浆样品中开始凝血后产生的凝血酶量的影响。在60分钟实验时程中,相较于仅用载剂处理的血浆,加入FXa^{I16L}引起凝血酶生成的剂量依赖性增加。

[0020] 图1B显示凝血酶生成试验(TGA)结果,测试加入不同浓度血浆源性活化的因子XpdFXa对正常人血浆样品中开始凝血后产生的凝血酶量的影响。在60分钟实验时程中,相较于仅用载剂处理的血浆,加入pdFXa引起凝血酶生成的剂量依赖性增加。

[0021] 图1C显示从图1A和图1B所描述的实验的数据计算的凝血起始期的滞后时间。相较于仅用载剂处理的人血浆,pdFXa和FXa^{I16L}都缩短滞后时间,尽管经FXa^{I16L}处理的血浆的滞后时间长于经pdFXa处理的血浆。

[0022] 图2A显示用渐增浓度的FXa^{I16L}预处理对非血友病小鼠尾切断后失血的影响。相较于仅用载剂处理的小鼠,尾切断前的FXa^{I16L}处理引起总失血的剂量依赖性减少。

[0023] 图2B显示用渐增浓度的FXa^{I16L}预处理对非血友病大鼠尾切断后失血的影响。相较于仅用载剂处理的大鼠,尾切断前的FXa^{I16L}处理引起总失血的剂量依赖性减少。

[0024] 图3A显示用渐增浓度的FXa^{I16L}处理对实验操作成产生脑内出血的小鼠血肿体积的影响,所述小鼠作为ICH动物模型。相较于仅用载剂处理的小鼠,在实验诱导出血进入脑组织后的FXa^{I16L}处理引起血肿体积的剂量依赖性减少。

[0025] 图3B显示相较于载剂的血肿体积减少百分比,与基于图3A数据的剂量相关。

[0026] 图4A显示用渐增浓度的FXa^{I16L}处理对实验操作成产生脑内出血的大鼠血肿体积的影响,所述大鼠作为ICH动物模型。相较于仅用载剂处理的大鼠,在实验诱导出血进入脑组织后的FXa^{I16L}处理引起血肿体积的剂量依赖性减少。

[0027] 图4B显示相较于载剂的血肿体积减少百分比,与基于图4A数据的剂量相关。

[0028] 图5是野生型人因子X前蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。信号肽对应于氨基酸1-23。前肽对应于氨基酸24-40。活化的因子X(FXa)的成熟轻链对应于氨基酸41-179。活化的FXa(移除激活肽后)的成熟重链对应于氨基酸235-488。激活肽(AP)对应于氨基酸183-234。

[0029] 图6是编码野生型人因子X前蛋白的cDNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。编码序列

对应于核苷酸58-1524。

[0030] 发明详述

[0031] 先前证明有酶原性质的凝血因子Xa变体有效抑制血友病动物中的不受控出血。然而,尚未知晓或预测此变体是否能在凝血系统完整的动物中有效停止不受控出血。申请者已证明此变体在非血友病动物中是有效促凝血剂且还能减少脑内出血非血友病动物模型中的血肿扩大。根据这些新研究,预期本公开的FXa变体和含这些变体的组合物可用于治疗和预防非血友病对象的ICH的方法中,所述对象包括人和非人动物。相较于未治疗对照,用FXa变体治疗ICH对象能改善对象的生活质量和神经系统功能并降低ICH所导致症状和损伤的严重性。用本公开的FXa变体和组合物治疗和预防ICH的方法如下进一步详细描述。

[0032] 因子Xa和其变体

[0033] 凝血因子X (FX) 是酶原,其在由内在的因子IX/因子VIII或外源途径(组织因子/因子VIIa) 激活后变成FXa,这是凝血酶原酶的蛋白酶部分。蛋白酶切Arg-Ile剪切键(scissile bond) 后,释放激活肽(AP),一系列明确的酶原结构变化推动向成熟活性丝氨酸蛋白酶的激活过程(参见Toso等,(2008) J. Biol. Chem. 283, 18627-18635; Bunce等,(2011) Blood 117, 290-298; 和Ivanciu等,(2011) Nat. Biotechnol. 29, 1028-1033, 通过引用全文纳入本文)。成熟FXa具有轻链和含催化结构域的重链。成熟FXa在凝血酶原酶复合物形成后变成活性丝氨酸蛋白酶,其包括结合活化辅因子即因子Va (FVa)。

[0034] 开发出FX变体形式,其在激活切割后产生酶原样FXa变体。即一旦切割,所得FXa变体有弱活性位点功能且更抗循环抑制剂(即抗凝血酶III和TFPI) 引起的失活。因此,FXa变体在血浆中的半衰期长于野生型FXa。FXa变体结合FVa、脂膜和钙以形成有效激活凝血酶原的完全活性凝血酶原酶复合物。

[0035] 酶原样FXa变体在酶原样构象中循环,似乎不致血栓(参见Toso等,(2008) J. Biol. Chem. 283, 18627-18635和Ivanciu等,(2011) Nat. Biotechnol. 29, 1028-1033, 通过引用全文纳入本文)。这类FXa变体示例描述于国际专利公开W02007/059513,所述专利通过引用全文纳入本文。

[0036] 凝血的酶是胰蛋白酶样酶,属于携带胰凝乳蛋白酶样折叠的蛋白酶的S1肽酶家族。凝血蛋白酶包含催化结构域,彼此之间且与消化的祖丝氨酸蛋白酶高度同源。结构同源性/相同性很大(>70%)从而凝血酶(包括因子Xa)的催化结构域中的残基根据胰凝乳蛋白酶原的对应残基编号。(Chymotrypsin numbering system; 参见Bajaj和Birktoft, Methods Enzymol. 1993; 222: 96-128, Table 2, 和Bode W, Mayr I, Bauman Y等, The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Trp insertion segment. EMBO J 1989; 8 (11): 3467-3475), 两者都通过引用全文纳入本文)。因此,在本文中氨基酸可以指的是本领域技术人员熟知的胰凝乳蛋白酶编号系统。

[0037] 根据本公开,FXa变体可以是含氨基酸取代的FXa蛋白,所述取代使变体相较于野生型FXa蛋白在体内或体外更像酶原。本公开的FXa变体在凝血酶原酶形成后基本恢复野生型FXa活性。用于本公开方法的FXa变体示例是含选自下组修饰的变体:a) 16位的Ile是Thr、Leu、Phe、Asp或Gly和b) 17位的Val是Leu、Ala或Gly,根据胰凝乳蛋白酶编号系统。胰凝乳蛋白酶编号系统中的氨基酸16和17分别在SEQ ID NO:1(人因子X前原蛋白)的氨基酸235和

236处出现。在某些实施方式中,FXa变体是FXa^{I16L}和FXa^{I16T}(本文用于FXa变体的命名法列举了胰凝乳蛋白酶编号系统所述编号位置处的初始氨基酸,然后是取代的氨基酸)。FXa变体可以是任何哺乳动物FXa的变体。然而,尤其对人FXa的FXa变体感兴趣。

[0038] 在某些实施方式中,活化成本公开变体FXa的FX变体可通过插入非天然胞内蛋白酶切位点来进一步修饰。在一个非限制性示例中,为在哺乳动物细胞中表达“活化”酶原样FXa变体,非天然胞内蛋白酶切位点能插入变体FX酶原中SEQ ID NO:1的234位(胰凝乳蛋白酶编号系统的15位)处的Arg与SEQ ID NO:1的235位(胰凝乳蛋白酶编号系统的16位)处的氨基酸之间。在某些实施方式中,非天然胞内蛋白酶切位点是Arg-Lys-Arg或Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg (SEQ ID NO:3)。这些切割位点由细胞内的蛋白酶(PACE/弗林蛋白酶样酶)有效识别并移除。此切割可产生经加工的变体FXa,其中成熟的分子重链目前开始于位置对应于SEQ ID NO:1 235位(胰凝乳蛋白酶编号系统的16位)的氨基酸。在所述位置引入此切割位点允许FX胞内转变成FXa。

[0039] 在某些实施方式中,FX变体激活肽(AP)的完整氨基酸序列(即SEQ ID NO:1的氨基酸183-234)被非天然胞内蛋白酶切位点取代。根据某些实施方式,非天然胞内蛋白酶切位点是Arg-Lys-Arg或Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg (SEQ ID NO:3)。如上所解释,此修饰允许胞内切割细胞表达的FX变体。胞内切割将FX变体转变成活化的酶原样FXa变体,其随后由细胞分泌用于后续纯化。另外需要胞外切割以激活变体凝血因子,例如在分离蛋白后或临凝血前,此方法避免了对胞外切割的需求。

[0040] 在某些实施方式中,本公开的FXa变体衍生自FX变体前蛋白,包含天然野生型人信号序列和/或前肽序列。在其它实施方式中,来自非人物种的FX信号序列和/或前肽能用于取代对应的天然氨基酸序列。在其它实施方式中,来自其它人或人分泌蛋白的信号序列和/或前肽序列能用于取代对应的天然氨基酸序列。

[0041] 在一个示范性实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中235位的氨基酸(野生型序列中的异亮氨酸)用选自下组的不同氨基酸取代:苏氨酸(Thr)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、天冬氨酸(Asp)或甘氨酸(Gly)。这些取代能分别用命名I235T、I235L、I235F、I235D和I235G书写,其中首字母是异亮氨酸的单字母代码且最后的字母是取代成野生型序列的氨基酸的单字母代码。由于SEQ ID NO:1的235位等同于胰凝乳蛋白酶编号系统的16位,相同取代能用I16T、I16L、I16F、I16D和I16G书写。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中235位的氨基酸用Thr取代(即I235T或I16T)。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中235位的氨基酸用Leu取代(即I235L或I16L)。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中235位的氨基酸用Phe取代(即I235F或I16F)。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中235位的氨基酸用Asp取代(即I235D或I16D)。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中235位的氨基酸用Gly取代(即I235G或I16G)。

[0042] 根据另一示范性实施方式,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中236位的氨基酸(野生型序列中的缬氨酸)用选自下组的不同氨基酸取代:亮氨酸(Leu)、丙氨酸(Ala)或甘氨酸(Gly)。这些取代能分别用命名V236L、V236A和V236G书

写,其中首字母是缬氨酸的单字母代码且最后的字母是取代成野生型序列的氨基酸的单字母代码。由于SEQ ID NO:1的236位等同于胰凝乳蛋白酶编号系统的17位,相同取代能用V17L、V17A和V17G书写。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中236位的氨基酸用Leu取代(即V236L或V17L)。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中236位的氨基酸用Ala取代(即V236A或V17A)。在一个实施方式中,FXa变体包括SEQ ID NO:1的氨基酸41-179和氨基酸235-488,其中236位的氨基酸用Gly取代(即V236G或V17G)。

[0043] 在其它实施方式中,包括前面段落所述特定变体在内的本公开FXa变体可包含蛋白质轻链和/或成熟重链的各种同种型。FXa变体成熟重链的非限制性示范性同种型包括 α 和 β 形式的成熟重链。Jesty等,J Biol Chem.1975年6月25日;250(12):4497-504,通过引用纳入本文。本公开的组合物可包括FXa变体蛋白,其中表示 α 和 β 成熟重链同种型之一或另一个或两者。

[0044] 根据其它实施方式,包括前面段落所述特定变体在内的FXa变体蛋白同种型可包括其中从蛋白轻链和/或成熟重链的羧基末端缺失或在所述羧基末端添加不同数量的氨基酸(例如1、2、3、4、5、6或更多个氨基酸)的同种型。

[0045] 根据某些实施方式,相较于SEQ ID NO:1野生型FXa的氨基酸序列,本公开的FXa变体包括具有最低程度同源性或序列相同性的蛋白。因此,例如,FXa变体包括含轻链和成熟重链的蛋白质,其与SEQ ID NO:1中野生型FXa轻和成熟重链的序列有至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同源性或相同性,其中这种FXa变体还包括在对应于SEQ ID NO:1的235位的氨基酸位置处用Thr、Leu、Phe、Asp或Gly的取代,或在对应于SEQ ID NO:1 236位的氨基酸位置处用Leu、Ala或Gly的取代,并且其中这类FXa变体是酶原性的,直至纳入凝血酶原酶复合物。在SEQ ID NO:1氨基酸序列中,野生型FXa轻链序列对应于氨基酸41-179且野生型FXa成熟重链序列对应于氨基酸235-488。氨基酸序列同源性或相同性百分比可以容易地用软件如Protein BLAST测定,所述软件可获自国家生物技术信息中心网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

[0046] 根据其它非限制性实施方式,本公开的FXa变体还能包括含一个或多个翻译后修饰的FXa变体,包括但不限于一个或多个O-连接或N-连接碳水化合物基团或可变数量的 γ -羧基谷氨酸(Gla)残基。本公开的FXa变体还能包括化学修饰的FXa变体蛋白。用于本公开方法的其它FXa变体也可行。

[0047] 本文所用的术语FXa^{I16x}指活化的因子X的变体,其中对应于SEQ ID NO:1的235位(胰凝乳蛋白酶编号系统的16位)的氨基酸从野生型序列的氨基酸(异亮氨酸)变成表示为“x”的不同氨基酸。在一些非限制性示范性实施方式中,氨基酸“x”可以是苏氨酸(Thr或T)、亮氨酸(Leu或L)、苯丙氨酸(Phe或F)、天冬氨酸(Asp或D)或甘氨酸(Gly或G)。

[0048] 本文所用的术语FXa^{V17y}指活化因子X的变体,其中对应于SEQ ID NO:1的236位(胰凝乳蛋白酶编号系统的17位)的氨基酸从野生型序列的氨基酸(缬氨酸)变成表示为“y”的不同氨基酸。在一些非限制性示范性实施方式中,氨基酸“y”可以是亮氨酸(Leu或L)、丙氨酸(Ala或A)或甘氨酸(Gly或G)。

[0049] 术语FXa^{I16x}和FXa^{V17y}不受SEQ ID NO:1所列蛋白序列限制。相反,这些术语额外包括本文所述多种同种型和同源蛋白,带有胰凝乳蛋白酶编号系统中16或17位的指定取代突

变,其性能如同酶原,直至纳入凝血酶原酶复合物。

[0050] 本公开的FXa变体可通过任何表达蛋白质的技术来生成。

[0051] “分离的蛋白质”、“分离的多肽”或“分离的变体”是,由于其衍生的起源或来源,(1)不与天然状态下伴随其的天然相关组分相关,(2)没有来自同一物种的任何蛋白,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)不天然出现的蛋白质、多肽或变体。因此,化学合成或在与其天然来源的细胞不同的细胞系统中合成的多肽与其天然相关组分“分离”。蛋白质还可通过使用本领域熟知的蛋白纯化技术分离而基本没有天然相关组分。

[0052] 当至少约60-75%的样品显示单一种类的多肽时,蛋白质或多肽是“基本纯”、“基本同源”或“基本纯化”。所述多肽或蛋白可以单聚或多聚。基本纯的多肽或蛋白质通常包括约50%、60%、70%、80%或90%W/W的蛋白质样品,更通常地约95%,且可以超过99%纯。蛋白纯度或均一性可通过本领域熟知的多种手段来指示,如蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳,接着在用本领域熟知的染料染色凝胶后肉眼观察单一多肽带。对于某些目的,用HPLC或本领域熟知的其它纯化方式可提供更高的分辨率。

[0053] 脑内出血

[0054] 脑内出血(ICH)是由脑中病变或受损血管破裂导致的中风形式,所述破裂引起出血进入脑组织(实质)。脑损伤和随之的神经功能缺损或死亡能通过不同机制引起。例如,认为血液渗漏可减少由受影响血管供给的脑细胞氧合。还认为滞积血可导致水肿,最终形成的血肿还能对周围脑组织施加压力。水肿和血肿能增加颅内压。其它ICH导致脑损伤的机制也可行。负责在ICH后或特定病例中导致脑损伤的特定一种或多种机制不意在以任何方式限制本公开的实施方式。

[0055] ICH能在任何脑部分发生。可发生ICH或能受不同脑部分所发生ICH影响的示范性脑区域包括但不限于大脑(包括额叶、顶叶、枕叶、颞叶)、小脑、脑干(包括中脑、脑桥、髓质)、脑下垂体、下丘脑、丘脑、海马体、杏仁核、屏状核或基底神经节。

[0056] ICH能作为脑内动脉出血的结果发生。示范性脑动脉包括但不限于大脑前动脉(ACA)、大脑中动脉(MCA)、大脑后动脉(PCA)、眼动脉、Willis环动脉、小脑后下动脉(PICA)或豆纹动脉。

[0057] 尽管某些指示颅内压增加的症状如头痛、恶心、呕吐和意识丧失,可表明存在ICH,但最终诊断需要脑成像。脑成像(也称为神经成像)技术为本领域普通技术人员熟知,包括计算机断层扫描(CT)、血管造影术、CT血管造影、磁共振成像(MRI)和MR血管造影。最终诊断ICH的其它技术为本领域普通技术人员熟知。

[0058] ICH没有缺血性卒中常见,后者由血栓引起的脑血管阻塞导致,但包括所有中风的约12%。与缺血性卒中不同,ICH在出血开始后的前24小时尤其是当出血伴随血肿扩大时,更可能显著恶化。如下进一步讨论,血肿扩大与患者预后不良相关。

[0059] 治疗脑内出血(ICH)的方法

[0060] 本公开提供治疗或预防ICH的方法,通过给需要ICH治疗的对象施用治疗有效量的具酶原性质的FXa变体,例如FXa变体FXa^{I16L}。

[0061] 本文所用的术语“对象”指有脑和凝血系统的任何动物,所述脑能患有脑内出血,所述凝血系统能用本公开的FXa变体激活。在一些实施方式中,所述动物是哺乳动物,例如人和非人灵长类(如猿、猴、狒狒、黑猩猩),或其它哺乳动物如啮齿动物(如小鼠、大鼠)、牛、

马、猫、狗、猪、兔、山羊、鹿、绵羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、仓鼠和蝙蝠。根据本领域普通技术人员的知识,其他动物也可行。

[0062] 在一些实施方式中,对象是非血友病哺乳动物,例如非血友病的人。在其它实施方式中,对象有血友病,可包括血友病A、血友病B或其它血友病类型。

[0063] 本文所用的短语“治疗有效量”指FXa变体(如FXa^{I16L})的量,其给具有ICH的对象施用使得所述对象由于ICH死亡的可能性降低,引起ICH所导致发病率下降,引起ICH所导致神经功能缺损减少,或使对象在ICH后的功能、生活质量或病症改善。治疗有效量的FXa变体能另外防止或降低ICH所导致血肿在出血开始或诊断ICH后的体积扩增程度,防止ICH所导致出血灶周围水肿体积增大或减少体积,或防止或降低可伴随(attend)ICH的颅内压增加。治疗有效量的FXa变体能另外延迟ICH所导致任何体征、症状、生理效应或神经功能缺损发生,或缓解、减轻或减弱其严重性。治疗有效量的FXa变体可根据诸如以下的因素而变化:待用的特定FXa变体性质、疾病状态、待治疗对象的年龄、性别和体重以及FXa变体在对象中引发所需反应的能力。治疗有效量还是FXa变体的治疗有益效果超过任何毒性或有害作用的量。

[0064] 短语“预防有效量”指FXa变体的量,其给有一个或多个ICH风险因素的对象施用时,降低对象患ICH的可能性或减少有类似风险谱的对象群体中ICH的发生率。

[0065] FXa变体的功效和有效量能根据对施用FXa变体的个体ICH对象的观察来测定。FXa变体的功效和有效量还能如下测定;根据本领域普通技术人员的知识,在确定ICH对象群体中进行对照临床研究。根据这类临床研究结果,护理提供者能提前预测哪个可能是有效量的FXa变体,然后施用新经历且需要ICH治疗的对象。

[0066] 尽管是想要的,但对于功效存在,不要求完全预防或逆转ICH的体征或症状(包括例如血肿扩大)或者ICH所导致神经功能缺损。相反,如上所示,相较于没有FXa变体治疗时可能出现的对象病症,有效量的FXa变体仅需改善ICH对象病症。

[0067] 减少ICH所导致死亡的方法

[0068] 据报道ICH所导致30天致死率范围为40%-50%,约一半的死亡在发生后2天内出现。ML Flaherty等,“脑内出血的流行病学(The epidemiology of intracerebral hemorrhage)”,收录于《脑内出血》(Intracerebral Hemorrhage),JR Carhuapoma等编(剑桥:剑桥大学出版社(Cambridge University Press),2010),其通过引用全文纳入本文。

[0069] 根据某些实施方式,给具有ICH的对象施用有效量FXa变体(如FXa^{I16L})能减少ICH所导致死亡发生率(死亡率)。这能通过,例如,比较FXa变体在确定ICH对象群体中相较于未治疗对照群体降低死亡率的能力进行证明。在一些实施方式中,治疗具有ICH的对象可使ICH所导致死亡率从约40%-50%降低到约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%或更少。在一些其它实施方式中,相较于未用FXa变体治疗的ICH对象的死亡率,用FXa变体治疗使ICH所导致死亡率降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多。死亡率可在ICH发生后的任何时间测定。非限制性示范性的发生后时间包括1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、14天、15天、20天、21天、25天、28天、30天或更多。

[0070] ICH后提高脑功能的方法

[0071] 在本公开方法的实施方式中,施用有效量的FXa变体(如FXa^{I16L})可提高ICH对象的

脑功能。

[0072] 在一个实施方式中,提高的脑功能与减少ICH所导致的增高的颅内压(ICP)到低于特定最高水平相关。例如,ICP能降低到等于或低于80mm Hg、70mm Hg、60mm Hg、50mm Hg、40mm Hg、30mm Hg、20mm Hg、10mm Hg或更少的水平。通过使ICP减少到低于特定水平,ICH对象死亡的可能性下降。监测ICP的方法为本领域普通技术人员熟知。S.-B.Ko等,Stroke 42:3087-3092(2011),通过引用纳入。

[0073] 在另一个实施方式中,提高的脑功能与维持特定最小水平的脑灌注压(CPP)相关。例如,CPP能维持于等于或超过40mm Hg、50mm Hg、60mm Hg、70mm Hg、80mm Hg、90mm Hg、100mm Hg、110、mm Hg、120mm Hg或更高的水平。通过维持足够水平的CPP,ICH对象经历脑代谢危象或脑组织缺氧的可能性减少。足够高的CPP还与ICH对象死亡率下降相关。监测CPP的方法为本领域普通技术人员熟知。S.-B.Ko等,Stroke 42:3087-3092(2011)。

[0074] 在另一个实施方式中,提高的脑功能与维持特定最小水平的脑组织氧分压($P_{bt}O_2$)相关。例如, $P_{bt}O_2$ 能维持于等于或超过6mm Hg、8mm Hg、10mm Hg、12mm Hg、14mm Hg、16mm Hg、18mm Hg、20、mm Hg、22mm Hg、24mm Hg或更高的水平。通过维持足够水平的 $P_{bt}O_2$,ICH对象经历脑代谢危象或脑组织缺氧的可能性减少。足够高的 $P_{bt}O_2$ 还与ICH对象死亡率下降相关。监测 $P_{bt}O_2$ 的方法为本领域普通技术人员熟知。S.-B.Ko等,Stroke 42:3087-3092(2011)。

[0075] 在另一个实施方式中,提高的脑功能与减少乳酸和丙酮酸浓度之比(LAR)到低于特定水平相关。更高的比例指示厌氧代谢。例如,LAR能减少至等于或低于60、50、40、30、20或更小的水平。通过使LAR减少到低于特定水平,ICH对象死亡的可能性下降。监测脑乳酸和丙酮酸浓度的方法为本领域普通技术人员熟知。S.-B.Ko等,Stroke 42:3087-3092(2011)。

[0076] 在另一个实施方式中,提高的脑功能与降低脑血管压力反应指数(PR_x)相关,其计算为平均颅内压(ICP)与平均动脉血压(MAP)之间的移动相关系数。C.Zweifel等,Neurosurg.Focus,25(10):E2(2008),通过引用纳入。例如,PR_x能减少至等于或低于0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.0、-0.1、-0.2、-0.3或更小的水平。通过使PR_x减少到低于特定水平,ICH对象死亡的可能性下降。监测ICH和MAP并能计算PR_x的方法为本领域普通技术人员熟知。S.-B.Ko等,Stroke 42:3087-3092(2011)。

[0077] ICH后减少神经功能缺损的方法

[0078] 除了死亡,ICH对对象最显著的影响是神经功能缺损,这通常严重,能破坏对象生活质量和对象的家庭以及造成巨大的社会成本。其中,神经功能缺损能干扰或妨碍ICH对象在无协助的情况下工作或进行普通的日常活动。通过用本公开的FXa变体治疗或预防对象的ICH,ICH所导致的神经功能缺损程度相较于没有治疗时同一对象或类似未治疗对照对象中会出现的缺损程度可降低。因此,根据本公开方法治疗的ICH对象独立工作或活动的能力提高。

[0079] 神经功能缺损能用神经功能评估工具量化。这种评估工具包括格拉斯哥昏迷评分(GCS)、格拉斯哥预后评分扩展版(GOS-E)、巴氏量表(BI)、NIH卒中量表(NIHSS)和改良的兰金量表(mRS)。其它评估工具也能根据本领域普通技术人员的知识使用,包括EuroQol量表、修订的汉密尔顿抑郁量表等。

[0080] 格拉斯哥昏迷评分意在描述ICH或其它脑损伤后对象的意识水平。GCS得分为3-

15,3最差而15最佳。其由3种参数构成,包括最佳眼反应、最佳语言反应和最佳运动反应。对于最佳眼反应,无睁眼=1;疼痛刺激睁眼=2;语言命令睁眼=3和自发睁眼=4。对于最佳语言反应,无语言反应=1;无意义的声音=2;不恰当的语言=3;混乱的=4和定向的=5。对于最佳运动反应,无运动反应=1;疼痛刺激伸展=2;疼痛刺激屈曲=3;逃避疼痛=4;疼痛定位=5和遵从指令=6。GCS为13或更高与轻度脑损伤相关,9-12是中度损伤,8或更小是重度脑损伤。

[0081] 格拉斯哥预后评分(GOS)和其扩展版(GOS-E)意在描述ICH或其它脑损伤后对象恢复如何。GOS有5个水平和相关评分,包括死亡=1;植物人状态(对象活着但无响应)=2;重度残疾(对象有意识但由于残疾而需要其他人的日常协助)=3;中度残疾(对象独立但残疾)=4和良好恢复(对象恢复大部分正常活动但可能有较小遗留问题)=5。

[0082] 在扩展GOS或GOS-E中,评分系统扩展到8个水平,其中死亡=1;植物人状态=2;低级重度残疾=3;高级重度残疾=4;低级中度残疾=5;高级中度残疾=6;低级良好恢复=7和高级良好恢复=8。

[0083] 巴氏量表(BI)是测量ICH或其它脑损伤后对象活动限制的等级量表。Mahoney F.和Barthel D.,*Functional evaluation:the Barthel Index.*,*Md Med J.*14:61-65(1965),通过引用纳入。该量表由10个功能类别组成,包括摄食能力、洗澡能力、打扮能力、穿衣能力、肠控制、膀胱控制、如厕、在床和椅子之间来回移动的能力、移动能力和使用楼梯的能力。对象就完成各类别指定活动所需的协助量进行评分。随后类别得分叠加以产生总活动分数。在不同版本的BI量表中,类别恒定,但分配给依赖程度的数值可变,从而最小和最大总评分随着所用版本而变化。例如,一些版本中,评分范围是0-20,而其它版本中,评分范围是0-100,但在所有版本中,评分越高,对象独立活动的的能力越大。

[0084] NIH卒中量表(NIHSS)是15项的神经检查卒中量表,用于评估ICH、中风或其它脑损伤对意识、语言、疏忽、视野缺损、眼外运动、运动强度、共济失调、构音障碍和感觉缺失水平的影响。训练有素的观察者就对象回答问题和实施活动的的能力分级。各项目分级用3-5级评分,0作为正常。0分指示无中风症状,1-4分指示轻度中风,5-15分指示中度中风,16-20分指示中度到重度中风,21-42分指示重度中风。

[0085] 改良的兰金量表(mRS)测量ICH、中风或其它脑损伤后对象残疾或日常活动依赖性的程度。得分范围是0-6,其中0指示无神经功能缺损症状;1指示尽管存在一些症状但无明显残疾;2指示轻度残疾(如能独立活动,但不能完成所有先前的活动);3指示中度残疾(如需要一些帮助,但能独立行走);4指示中重度残疾(如不能处理身体需求或独立行走);5指示重度残疾(如需要不断护理、卧床不起、失禁)和6指示死亡。

[0086] 在一些实施方式中,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{116L})治疗ICH对象可有效减少ICH所导致神经功能缺损,如用神经功能缺损评估工具所测。根据一些实施方式,神经功能评估工具包括格拉斯哥昏迷评分(GCS)、格拉斯哥预后评分扩展版(GOS-E)、巴氏量表(BI)、NIH卒中量表(NIHSS)或改良兰金量表(mRS)。使用其它工具也可行。如果使用GCS、GOS、GOS-E、BI,则神经功能缺损减少通过评分增加来反映。

[0087] 在一些实施方式中,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{116L})治疗ICH对象使对象的格拉斯哥昏迷评分有效增加1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12。在其它实施方式中,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{116L})治疗ICH对象使对象的格拉斯哥预后评分,包括其扩展

版,有效增加1、2、3、4、5、6或7。在其它实施方式中,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{I16L})治疗ICH对象使对象的巴氏量表评分有效增加1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20,或如果使用更广的评分范围,增加至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或更多。

[0088] 如果使用NIHSS或mRS,则神经功能缺损减少通过评分降低来反映。在一些实施方式中,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{I16L})治疗ICH对象使对象的NIH卒中量表评分有效降低至少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、33、34、35、36、37、38、39、40、41或42。

[0089] 改良的兰金量表常用于评价ICH所导致对象残疾或依赖性的程度。在一些实施方式中,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{I16L})治疗ICH对象使平均mRS得分从约5-6降低到约4-5,从约4-5降低到约3-4,从约3-4降低到约2-3,从约2-3降低到约1-2,或从约1-2降低到约0-1。在其它实施方式中,相较于无治疗,用有效剂量的FXa变体治疗ICH对象可增加经历平均mRS得分降低的对象比例,所述得分从约5-6降低到约3-4,或从约3-4降低到约1-2。

[0090] 在其它实施方式中,相较于无治疗,用有效剂量的FXa变体治疗ICH对象可降低改良的兰金量表评分为5或6的对象与评分为0、1、2、3或4的那些相比的比例,或降低评分为4、5或6的对象(鉴定为不良)与评分为0、1、2或3的那些(鉴定为良好)相比的比例。在其它实施方式中,相较于无治疗,用有效剂量的FXa变体治疗ICH对象可降低评分为2、3、4、5或6的对象与评分为0或1的那些相比的比例。在其它实施方式中,相较于无治疗,用有效剂量的FXa变体治疗ICH对象可降低从mRS评分2、3、4或5发展到mRS评分6的对象比例。

[0091] 根据一些实施方式,相较于未治疗的对照ICH对象,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{I16L})治疗ICH对象使神经功能缺损由于治疗而减少的ICH对象比例有效增加至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多。

[0092] 评价神经功能缺损能用评估工具在ICH治疗后的不同时间进行。例如,神经功能缺损在能用FXa变体治疗ICH后7天、10天、14天、20天、21天、28天、30天、40天、50天、60天、70天、80天或90天或更久进行测量。根据普通技术人员知识,在治疗后其它时间测量也可行。

[0093] ICH后防止或减少水肿的方法

[0094] 继发于ICH的出血灶周围水肿(PHE)也可能对患者发病率有作用。不希望受任何具体操作理论约束,认为初始损伤后的凝血和血肿分解产物开启对出血灶周围脑组织的二级级联损伤,导致PHE发展。水肿平均是潜在血肿体积的约2倍,可引起颅内压增加和占位效应,如疝形成。D.Staykov等,Stroke 42:2625-2629(2011),通过引用纳入。水肿体积增加与死亡和残疾正相关。H.Arima等,Neurology 73:1963-1968(2009),通过引用纳入。水肿体积能用神经成像技术测量,如本文他处所述的MRI或CT扫描。

[0095] 本公开还提供预防或减弱ICH相关出血灶周围水肿(PHE)的方法,这是通过将治疗有效量的有酶原性质的FXa变体施用经历ICH的对象,包括人患者。在一些实施方式中,所述FXa变体是FXa^{I16L}。相较于未用FXa变体治疗的ICH患者的水肿体积,用治疗有效剂量的FXa变体治疗后的水肿体积可减少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多。在一些实施方式中,在FXa给ICH对象

施用前,水肿体积用神经成像或本领域普通技术人员熟知的其它技术测量。然后,水肿体积能在FXa变体治疗后至少测量一次,开始监测水肿体积变化(如果有)。在某些实施方式中,水肿体积能在FXa变体治疗后1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、9小时、12小时、18小时、24小时、48小时、72小时、96小时、5天、6天、7天、14天、21天或更久测量,开始监测水肿体积变化。

[0096] 根据其它实施方式,PHE后遗症的发生率或严重性如脑组织压缩所导致颅内压增高或疝形成,能通过给ICH患者施用治疗有效量的有酶原性质的FXa变体来降低。在一些实施方式中,所述FXa变体是FXa^{I16L}。相较于未用FXa变体治疗的ICH患者,用治疗有效剂量的FXa变体治疗的ICH患者中PHE后遗症的发生率或严重性(包括但不限于水肿或疝形成)可减少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多。

[0097] 减少或防止血肿扩大的方法

[0098] ICH所导致初始出血后,约30%的ICH患者继续出血,导致明显的血肿扩大。Brouwers和Greenberg, *Cerebrovasc. Dis.* 35:195-201 (2013)。不幸地,血肿扩大与较差预后结果相关。Davis (2006); Dowlatshahi等, *Neurology* 76:1238-1244 (2011)。为治疗此ICH患者亚群,含本公开FXa变体的组合物能以有效减少或甚至防止血肿扩大的剂量施用。

[0099] 测量血肿体积的多种技术为普通技术人员熟知,血肿体积在ICH后开始和之后随着时间变化。非限制性示例包括脑成像技术,如CT、CTA、MRI或MRA。特定方法包括ABC/2,有调整的C值的ABC/2、测量面积和3D容积重建。使用计算机软件根据脑扫描期间收集的数据计算体积是常见的。

[0100] 血肿体积能根据首次脑扫描收集的数据计算,所述扫描用于明确诊断ICH从而建立基线体积。血肿体积还能在之后的一个或多个预定时间检测,以监测血肿体积是稳定还是扩大,且如果扩大,则监测速度如何。

[0101] 在一些实施方式中,血肿扩大能定量为基线脑扫描后一次或多次预定时间的体积增加百分比。一些时间段相较于基线的非限制性示范性相对血肿体积增加包括约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%或更多。在其它实施方式中,血肿扩大能定量为基线脑扫描后一次或多次预定时间的体积绝对增加。一些时间段相较于基线的非限制性示范性血肿体积绝对增加包括约1毫升(ml)、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml、5ml、5.5ml、6ml、6.5ml、7ml、7.5ml、8ml、8.5ml、9ml、9.5ml、10ml、10.5ml、11ml、11.5ml、12ml、12.5ml、13ml、13.5ml、14ml、14.5ml、15ml、16ml、17ml、18ml、19ml、20ml、22ml、24ml、26ml、28ml、30ml、35ml、40ml、45ml、50ml或更多。

[0102] 在非限制性示例中,血肿体积能在基线测量血肿体积后约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、9小时、12小时、15小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时或更久测量,用于确定体积是否增加,且如果有,确定量。可多次扫描同一对象从而以更高分辨率随着时间追踪血肿扩大。

[0103] 根据某些非限制性实施方式,当计算的血肿体积增加(若存在)超过一定阈值,采用绝对体积基础或相对体积增加百分比,则血肿扩大可定义为发生。因此,例如,当预定时间段后体积相较于基线增加3毫升(ml)或更多、6ml或更多、或12.5ml或更多,或者另一些绝

对体积增加,则血肿扩大可认为发生。或者,当预定时间段后体积相较于基线增加15%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或更多、33%或更多,或另一些体积百分比增加,则血肿扩大可认为发生。

[0104] 根据一些实施方式,用有效剂量的本公开FXa变体(如FXa^{I16L})治疗具有ICH的对象可有效减少或防止另外会发生例如在未治疗对照中的血肿扩大。在一些实施方式中,ICH对象在呈现ICH前已经或正接受抗凝治疗。在一些其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使另外情况下会在一定时间段发生的血肿体积平均扩大降低至少1ml、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml、5ml、5.5ml、6ml、6.5ml、7ml、7.5ml、8ml、8.5ml、9ml、9.5ml、10ml、10.5ml、11ml、11.5ml、12ml、12.5ml、13ml、13.5ml、14ml、14.5ml、15ml、16ml、17ml、18ml、19ml、20ml、22ml、24ml、26ml、28ml、30ml、35ml、40ml、45ml、50ml或更多。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使另外情况下会在一定时间段发生的血肿体积平均扩大降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使另外情况下会在一定时间段发生的血肿体积平均扩大降低至少约5%-15%、约10%-20%、约15%-25%、约20%-30%、约25%-35%、约30%-40%、约35%-45%、约40%-50%、约45%-55%、约50%-60%、约55%-65%、约60%-70%、约65%-75%、约70%-80%、约75%-85%、约80%-90%、约85%-95%或约90%-100%。

[0105] 根据一些实施方式,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象可有效降低经历血肿扩大的对象比例。在一些实施方式中,所述比例从约30%或更多下降到约25%或更少,20%或更少,15%或更少,10%或更少,或5%或更少。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗有效使在一定时间段中经历血肿扩大的ICH对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0106] 在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使在一定时间段中血肿体积增加的对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多,所述体积增加3ml或更多、6ml或更多、或12.5ml或更多(或另一些量或更多)。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使在一定时间段中血肿体积增加的对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多,所述体积增加15%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或更多、33%或更多(或另一些百分比或更多)。

[0107] 所谓的“斑点征”的存在与血肿扩大和较差预后结果相关并预测其,所述斑点征用CT血管造影或其它方法鉴定。斑点征对血肿扩大的预测价值,甚至对症状发生后超过6小时去医院的患者也存在。Brouwers等,Neurocrit Care 17:421-428(2012)。

[0108] 斑点征是急性原发性实质血肿内的一个或多个小对比增强病灶。不希望受任何具体操作理论约束,认为斑点征的存在归因于活性外渗。Wada等,Stroke 38:1257-1262(2007);Brouwers等,Stroke 43:3427-3432(2012);Demchuk等,Lancet Neurol.11:307-314(2012)。

[0109] 提出基于斑点征特性的评分系统,这是根据斑点征数目、最大轴向尺寸和最大衰减量。Delgado等,Stroke 40:2994-3000 (2009)。斑点征存在时,得分范围从1到多至4,1对应于存在1或2个斑点征,各自尺寸小于5mm并显示衰减小于180HU,4对应于存在3个或更多斑点征,其中轴向尺寸最大的是5mm或更高并显示最大衰减为180HU或更多。零分指示没有斑点征存在。得分与血肿扩大风险高度相关。

[0110] 根据一些实施方式,有特定斑点征得分的具有ICH的对象能用本公开的FXa变体治疗。因此,例如,斑点征得分为4、3、2或1的具有ICH的对象能用本公开的FXa变体治疗。在其它实施方式中,用FXa变体治疗具有ICH的对象在特定对象中降低斑点征得分。因此,例如,初始呈现斑点征得分为4的ICH对象可由于FXa变体治疗而降低其得分到3、2、1或0。初始呈现斑点征得分为3的ICH对象可由于FXa变体治疗而降低其得分到2、1或0。初始呈现斑点征得分为2的ICH对象可由于FXa变体治疗而降低其得分到1或0。初始呈现斑点征得分为1的ICH对象可由于FXa变体治疗而降低其得分到0。

[0111] 在某些实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使呈现斑点征得分为4的对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使呈现斑点征得分为3的对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。根据其它实施方式,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使呈现斑点征得分为2的对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象使呈现斑点征得分为1的对象比例降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在其它实施方式中,相较于未治疗对照,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使呈现斑点征得分为0的对象比例增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%或更多。根据其它实施方式,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象有效使任何斑点征发生率降低约5%-15%、约10%-20%、约15%-25%、约20%-30%、约25%-35%、约30%-40%、约35%-45%、约40%-50%、约45%-55%、约50%-60%、约55%-65%、约60%-70%、约65%-75%、约70%-80%、约75%-85%、约80%-90%、约85%-95%或约90%-100%。

[0112] 根据某些实施方式,在施用本公开的FXa变体前后的预定时间神经成像后,可测定斑点征得分。在一些实施方式中,例如,在首次或后续施用FXa变体后30分钟、45分钟、60分钟、75分钟、90分钟、2小时小时、2.5小时小时、3小时小时、3.5小时小时、4小时小时、5小时小时、6小时小时、7小时小时、8小时小时、9小时小时、10小时小时、11小时小时、12小时小时、18小时小时、24小时小时、30小时小时、48小时小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、18天、3周、4周或另一些时间段,测定斑点征得分。

[0113] 治疗有ICH风险因素的患者方法

[0114] 已鉴定多种有助于ICH风险增加的人类患者风险因素。ML Flaherty等,“脑内出血的流行病学”,收录于《脑内出血》,JR Carhuapoma等编(剑桥:剑桥大学出版社,2010);

Brouwers等, *Neurocrit Care* 17:421-428 (2012); Appelboom等, *J. Stroke Cereb Dis.*, 22:713-717 (2013), 各通过引用全文纳入。根据某些实施方式, 本公开的FXa变体例如FXa^{I16L}, 能以治疗有效量给有一个或多个ICH风险因素的人ICH患者施用, 从而治疗或预防这些患者的ICH。

[0115] 年龄是最显著的风险因素, ICH率在60岁以上个体中大幅上升。因此, 在本公开的一些方法中, 给60岁或以上患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0116] 相反, 高血压是ICH的最重要可改变风险因素, 在超过70%的ICH患者中存在。未治疗的高血压相比受治疗控制的高血压是更高的风险因素, 中断用药的治疗中高血压患者的风险高于维持药物的那些患者。高血压是深半球和脑干区中出血以及叶ICH的风险因素。高血压作为ICH风险因素在年轻人中的相对影响高于老年患者。因此, 在本公开的一些方法中, 给高血压患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0117] 使用非法拟交感神经药例如可卡因和安非他命, 与ICH相关。因此, 在本公开的一些方法中, 给使用非法拟交感神经药的ICH患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}。

[0118] 脑淀粉样血管病(CAA)也是老年人中叶ICH的重要风险因素。CAA表征为淀粉样蛋白沉积于柔脑膜动脉、小动脉、毛细血管和有时静脉的中膜和外膜。因此, 在本公开的一些方法中, 给脑淀粉样血管病患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0119] 载脂蛋白E(APOE) ϵ 2和 ϵ 4等位基因是脑叶区中ICH的独立风险因素, 可能作为这些基因参与CAA的结果。Brouwers等, *Stroke* 43:2120-2125 (2012), 通过引用纳入。因此, 在本公开的一些方法中, 给有APOE等位基因 ϵ 2和 ϵ 4的患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0120] 血管畸形包括动静脉畸形(AVM)、海绵状静脉畸形、硬脑膜动静脉瘘、静脉畸形和毛细血管扩张症, 都与ICH相关。颅内小动脉瘤也能导致ICH, 如果其出血流入脑实质而不流入蛛网膜下腔, 这更典型。因此, 在本公开的一些方法中, 给血管畸形患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0121] 使用抗凝剂如华法林预防缺血性中风, 与ICH发生率增加相关。抗凝患者中ICH的相对风险比一般群体高约7-10倍。关联使用血栓溶解剂和抗凝剂来实现心肌梗塞或缺血性中风的血栓溶解, 与小但增加的ICH风险相关。在心肌梗塞的血栓溶解中, 大部分出血位于脑叶区。使用抗血小板药如阿司匹林或氯吡格雷, 也是ICH的次要风险因素。因此, 在本公开的一些方法中, 给服用抗凝剂(如华法林)或抗血小板(如氯吡格雷)药的患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0122] 脑实质中的微出血用梯度回波MRI检测, 其在ICH患者中常见并被视作小血管病变和ICH倾向状态的标志物。另外, 先前的脑梗死与5倍-22倍增加的ICH风险相关。因此, 在本公开的一些方法中, 给脑微出血或先前有脑梗死的患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0123] 低胆固醇血症(与缺血性中风风险因素高胆固醇血症相反)是ICH的风险因素。因此, 在本公开的一些方法中, 给低胆固醇血症患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。

[0124] 其它ICH风险因素包括酗酒和烟草使用, 酗酒与血肿扩大相关。也认为糖尿病是ICH的次要风险因素。因此, 在本公开的一些方法中, 给酗酒或使用烟草的患者或者糖尿病

患者施用FXa变体例如FXa^{I16L}以治疗或预防ICH。也能给其中创伤、感染或肿瘤是ICH唯一或附带原因的患者施用FXa^{I16L}或另一FXa变体以治疗或预防ICH。

[0125] 涉及ICH治疗的其它方法

[0126] 在其它实施方式中,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象可有效减少对象中ICH所导致的残疾。残疾的非限制性示例包括无以下能力或能力降低或受损:驾车、独立照顾自己、工作、阅读、说话、移动、走路、与其他人互动或其它残疾类型。

[0127] 根据其它实施方式,用本公开的FXa变体治疗具有ICH的对象可有效改善这类对象的临床状态。临床状态改善的非限制性示例包括减少进入康复设施前的住院天数(例如住院天数减少1、2、3、4、5、6、7、8或更多天);使患者状态的严重性降级(例如从临界到严重或更佳,严重到一般或更佳,一般到良好);减少ICH患者许可进入神经重症监护病房的天数(例如减少1、2、3、4、5、6、7、8或更多天);或减少ICH患者在重获独立呼吸能力前需要由机械呼吸机协助的天数(例如减少1、2、3、4、5、6、7、8或更多天)。

[0128] 施用FXa变体以治疗或预防ICH

[0129] 在ICH症状发生后或ICH诊断确认后,应尽快给患者施用FXa变体如FXa^{I16L}。如本文所示,可在某些症状呈现后怀疑ICH并通过神经成像确认,如通过MRI或CT扫描。根据本公开的某些实施方式,在ICH症状发生后12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时或更少时间内给患者施用FXa变体。在其它实施方式中,在通过神经成像或本领域普通技术人员熟知的其它技术确认ICH诊断后8、7、6、5、4、3、2、1小时或更少时间内给患者施用FXa变体。

[0130] 实现足以治疗或预防ICH的FXa变体目标血浆浓度在本领域普通技术人员的知识范围内。在一个非限制性示例中,能根据对象性别、身高和体重或其它因素来估计相关药代动力学参数如对象血浆体积或其它参数,并用于计算需要施用多少FXa变体以达到目标浓度。施用FXa变体后,血浆浓度能根据本领域普通技术人员的知识监控且此信息用于维持任何所需范围的浓度。

[0131] 可调整剂量方案以提供最优所需反应(如治疗或预防反应)。例如,能施用单次大剂量(bolus),可随着时间施用数个分开剂量或剂量能成比例缩小或增加,如治疗情况的紧急状态所示。

[0132] 剂量值可根据诸如以下因素而变化:所用特定FXa变体和其单独使用还是与另一治疗剂联用,待治疗群体、亚群或个体对象的独特性质,预期的特定治疗或预防效果。本领域普通技术人员会理解可影响剂量值的其它因素。此外,对于任何具体对象,根据个体需求和施用或监督FXa变体组合物施用的护理提供者的专业判断,特定剂量方案可能需要随着时间调整。因此,本文所列剂量方案仅是示范性的,不意在限制要求权利的FXa组合物和其应用方法的范围或实践。

[0133] 在某些实施方式中,本公开FXa变体的治疗或预防有效量是约0.0001-50mg/kg、约0.001-50mg/kg、约0.001-5mg/kg、约0.001-0.5mg/kg、约0.001-0.05mg/kg、约0.01-5mg/kg或约0.01-0.5mg/kg。在其它实施方式中,治疗或预防有效量的本公开FXa变体血液或血浆浓度是约0.0003-300nM、约0.003-300nM、约0.03-300nM、约0.003-30nM、约0.03-30nM或约0.3-3nM。其它剂量或血液或血浆浓度也可行。FXa变体浓度例如血液或血浆浓度可通过本领域已知的任何方法测量。

[0134] 可给对象一次或多次施用FXa变体,例如采用含这种变体的组合物,直至实现合适

的治疗或预防效果。采用多次施用，其可每小时、每日或以任何其它合适间隔给药，包括例如多次日剂量。多剂量可根据方案施用，如每10分钟、每15分钟、每20分钟、每30分钟、每小时、每2小时、每3小时、每4小时、每5小时、每6小时、每日3次、每日2次、每日1次、每隔2天、每隔3天、每周1次，或另一些方案。FXa变体还可连续施用，例如通过微型泵。可通过例如胃肠外途径（如静脉内、皮下、腹腔内或肌肉内）施用FXa变体。FXa变体一般作为本文所述药物组合物的一部分给药。

[0135] FXa变体给药能与对象监测联合以定制剂量方案，其最优治疗对象ICH和产生作用，如水肿或血肿扩大。因此，根据一些实施方式，给ICH对象施用FXa变体剂量，所述对象之后经历神经成像以确定脑内出血、水肿或血肿扩大是否停止或至少减小。扫描结果指示出血、水肿或血肿扩大未停止或至少足够改善时，能施用另一剂FXa变体。重复给药和监测对象的过程能持续直至对象病症足够改善，所述过程用于评价FXa变体对脑内出血、水肿或血肿扩大的影响。给药与监测之间的合适间隔能根据本领域普通技术人员知识确定。非限制性示例包括15分钟、30分钟、45分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、5小时、6小时或更多。

[0136] 在另一个实施方式中，本公开的FXa变体可与至少第二活性治疗剂共同施用（联合疗法）。在一些实施方式中，所述第二药剂可以是本公开的不同FXa变体。在其它实施方式中，所述第二药剂可以是另一凝血因子或其变体，包括例如因子IX、因子XIa、因子XIIa、因子VIII、因子VIIa，促凝血组合物如FEIBA或凝血酶原复合物浓缩物（PCC），或抗纤溶剂如 ϵ -氨基己酸、凝血酸或抑肽酶。

[0137] 本公开的FXa变体与至少第二治疗剂共同施用时，可在同一组合物中同时一起施用或在分开的组合物中同时或依序施用。或者，FXa变体与至少第二治疗剂能在分开的组合物于不同时间施用。含FXa变体的组合物能在含至少第二治疗剂的组合物前后施用。依序施用之间的间隔可随着FXa变体与第二治疗剂施用而变化，其在某些实施方式中于同一天发生。例如，FXa变体可每隔一天施用一次，而第二治疗剂每天一次给药，与FXa变体相同或在施用2种药剂的日子的不同时间。

[0138] 联合疗法可每小时、每日或每周多次给药。可根据方案施用，如每10分钟、每15分钟、每20分钟、每30分钟、每小时、每2小时、每3小时、每4小时、每5小时、每6小时、每日3次、每日2次、每日1次、每2天1次、每3天1次、每周1次，或另一些方案。FXa变体还可连续给药，例如通过微型泵。可施用联合疗法，例如通过胃肠外途径（如静脉内、皮下、腹腔内或肌肉内）。

[0139] 在其它实施方式中，本公开的FXa变体能与另一疗法协作施用以有效治疗ICH。在非限制性示例中，能在施用药物以降低有ICH的对象血压或颅内压或接受手术以如移除ICH所导致血肿之前、同时或之后施用FXa变体。在其它示例中，能在药物前、同时或之后施用FXa变体以预防或治疗癫痫或发烧，其各自伴随ICH。R. Sahni和J. Weinberger, Vasc Health Risk Manag 3:701-709 (2007)，通过引用纳入。

[0140] 另一方面，本公开提供含FXa变体的组合物以用于治疗或预防对象ICH。组合物能包括药学上可接受载体、载剂或生理上相容的其它成分。这类载体、载剂和其它成分的非限制性示例包括溶剂（如水、乙醇、盐水、磷酸盐缓冲盐水）、去垢剂、表面活性剂、分散介质、涂层剂、抗菌剂或抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂、糖（如蔗糖、右旋糖、乳糖）、多元醇（如甘油、甘露醇、山梨醇）、盐（如氯化钠、氯化钾）、湿润剂、乳化剂、防腐剂、缓冲剂以及能提高

FXa变体稳定性或效力的药剂。

[0141] 根据本发明使用的组合物可采用任何合适形式以给对象施用,如液体溶液(如可注射和不溶性溶液)。组合物可以预备好给对象施用的预混合形式提供,例如小瓶或预填充注射器。这种形式不需要在施用前用稀释剂复水。或者,组合物能以冻干形式提供,需要在施用前用稀释剂(如无菌水或盐水)复水。若是后者,稀释剂能与冻干物一起在分开容器中提供。根据本领域普通技术人员知识,组合物能配制用于冷藏或室温存储。组合物形式至少部分取决于预期的施用模式。在某些实施方式中,施用模式是胃肠外,包括例如静脉内、皮下、腹腔内或肌肉内施用。

[0142] 为了便于施用和剂量均匀度,胃肠外组合物以及其它类型可以剂量单位形式配制。剂量单位形式指物理离散单元,适合作为单一剂量用于待治疗对象,各单元含有计算的产生所需治疗效果的预定量的活性化合物以及所需药物载体。

[0143] 治疗组合物通常在制造和储存条件下必须无菌和稳定。所述组合物能配制为溶液、微乳剂、分散液、脂质体中、或适合高药物浓度的其它有序结构。无菌可注射溶液可如下制备:将所需量的FXa变体纳入合适溶剂,根据需要用上面所列成分之一或组合,然后过滤灭菌。一般,分散液如下制备:将活性化合物纳入含碱性分散介质和所需其它成分的无菌载体,所述成分来自上面所列的那些。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末情况中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加任何另外所需成分的粉末,来自其先前无菌过滤的溶液。能维持溶液的适当流动性,例如通过用涂层剂如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需粒度以及通过使用表面活性剂。通过将延迟吸附的试剂如单硬脂酸盐和明胶纳入组合物,能引起可注射组合物延长吸附。

[0144] 本公开还提供试剂盒,包含FXa变体或含这种FXa变体的组合物。试剂盒可以进一步包括诊断剂或一种或多种另外的治疗剂。试剂盒还可包括用于治疗方法的说明书以及包装材料。试剂盒可额外包括容器中的一或多个单位剂量形式,所述容器设计用于方便护理提供者施用。非限制性示例包括小瓶或预填充注射器。还能包括用于冻干组合物的稀释剂。

[0145] 应理解本文所述实施例和实施方式仅用于阐明目的,根据其的多种修改或变化对本领域技术人员显而易见并纳入本发明真实范围,能进行修改或变化而不偏离本发明真实范围。

实施例

[0146] 实施例1:FXa^{I16L}促进正常血浆中的血块形成

[0147] FXa^{I16L}和血浆源性FXa(pdFXa)的活性如下评估:测量柠檬酸盐混合血浆中的活化部分凝血活酶时间(aPTT),所述血浆分离自健康人类对象。通过向柠檬酸盐血浆加入表面活性剂和稀释的磷脂,进行aPTT试验。在温育以激活接触因子(因子XII、因子XI、前激肽释放酶和高分子量激肽原)的后,加入钙并测量凝血时间。测定期间产生低水平的FVa和FVIIIa。

[0148] 加入浓度增大的pdFXa或FXa^{I16L}引起剂量依赖性缩短凝血时间。就FXa^{I16L}和pdFXa计算的预估EC₅₀分别是45ng/mL和9ng/mL。

[0149] 在分离自正常小鼠、大鼠和食蟹猴的柠檬酸盐血浆中进一步检测FXa^{I16L}活性。凝血时间用aPTT测定检测。与人血浆内观察到的类似,加入FXa^{I16L}在所有3个种类中引起剂量

依赖性缩短凝血时间。在食蟹猴、小鼠和大鼠中就FXa^{I16L}计算的预估EC₅₀分别是49、89和91ng/mL。

[0150] 凝血酶生成试验(TGA)测量凝血酶生成的起始期、激活期和灭活期。在凝血开始后,TGA随着时间测量血浆中的凝血酶生成并如前所述进行(Bunce等,Blood 117:290-298 (2011),通过引用全文纳入本文)。在用于这些研究的条件下,1pM组织因子(TF)用于起始凝血。在分离自健康对象的去血小板柠檬酸盐人血浆中测量凝血酶生成(TG)。在实验的60分钟时程中,加入FXa^{I16L}或pdFXa引起凝血酶生成的剂量依赖性增加(图1A,图1B)。相较于载剂处理的人血浆,就pdFXa和FXa^{I16L}都观察到滞后时间(起始期)缩短。然而,在绝对数中,FXa^{I16L}滞后时间长于pdFXa(图1C)。对于所述对TGA滞后时间的效果,就FXa^{I16L}计算的预估EC₅₀是9ng/mL。FXa^{I16L}和pdFXa的峰值凝血酶生成类似,峰值凝血酶浓度范围分别是233-352nM和198-349nM。

[0151] 上面概括的数据证明FXa^{I16L}在来自非血友病动物的血浆中有效加速血块形成,所述动物包括人。

[0152] 实施例2:FXa^{I16L}在非血友病啮齿动物出血模型中引起止血

[0153] FXa^{I16L}在非血友病动物中引起止血的能力如下测试:在非血友病小鼠和大鼠中,测量对断尾损伤后失血的影响。剪尾导致严重出血,挑战凝血系统。

[0154] 给正常C57B1/6小鼠静脉施用不同剂量(0、1、10、25、50、100和200μg/kg)的FXa^{I16L}。2分钟后,尾巴从末端横切3mm,以微升(μl)测量直至止血的总失血。对照小鼠用载剂注射。结果示于图2A,其中数据表示为均值±SEM,“*”指示在p值<0.05的统计学显著性,“***”指示在p值<0.001的统计学显著性。对于载剂,测试5只动物。对于施用不同FXa^{I16L}剂量的动物,6只以1μg/kg测试,8只以10μg/kg测试,8只以25μg/kg测试,6只以50μg/kg测试,8只以100μg/kg测试,5只以200μg/kg测试。

[0155] 相较于载剂处理的小鼠,尾横切前的FXa^{I16L}处理引起总失血剂量依赖性减少12%(1μg/kg)、16.6%(10μg/kg)、26.7%(25μg/kg)、45.3%(50μg/kg)、62.9%(100μg/kg)和69.6%(200μg/kg)。预估ED₅₀是46μg/kg。

[0156] 第二研究中,在正常雄性CD-1小鼠用25μg/kg FXa^{I16L}或载剂处理后2分钟,测量血浆凝固活性,采用活化部分凝血活酶时间(aPTT)测定和凝血酶生成试验(TGA)。在来自经处理动物的血浆中,aPTT显示凝血时间缩短67%且TGA滞后时间缩短85%。还用TEG测量全血中的凝血活性,所述全血来自用10μg/kg或25μg/kg FXa^{I16L}或载剂处理的CD-1小鼠。给药后2分钟,相较于仅接受载剂的小鼠,用2种FXa^{I16L}剂量处理的动物中血的TEG R值减少70%。

[0157] FXa^{I16L}的止血活性也在正常雄性Sprague-Dawley大鼠的剪尾重伤模型中测试。相较于载剂处理的大鼠,用FXa^{I16L}预处理的大鼠显示出出血剂量依赖性减少5.7%(10μg/kg)、11.3%(30μg/kg)、49.0%(50μg/kg)、63.2%(100μg/kg)和59.45%(200μg/kg)。结果示于图2B,其中“*”指示在p值<0.05的统计学显著性。各剂量采用总共5-7只大鼠。方法与用小鼠的实验类似。预估ED₅₀是38μg/kg。全血中的离体活性用TEG测量。用1、5、10或30μg/kg FXa^{I16L}处理大鼠后2分钟,相较于仅接受载剂的大鼠,在剂量10μg/kg和30μg/kg观察到的TEG-R值分别减少38.2%和43.6%。

[0158] 实施例3:FXa^{I16L}在ICH啮齿动物模型中减少血肿体积

[0159] 在ICH小鼠模型中研究FXa^{I16L}。此模型中,将细菌胶原酶定向注入脑纹状体。

F.Schlunk等,Stroke 43:246-249 (2012);C.Foerch等,Stroke 39:3397-3404 (2008),其通过引用全文纳入。围绕注射位点附近毛细血管的胞外基质的蛋白水解消化引起出血,其模拟连续出血导致的ICH患者血肿扩大。

[0160] 在用FXa变体的实验中,通过将细菌胶原酶定向注入小鼠右侧纹状体来诱导ICH。胶原酶注射后45分钟,FXa^{I16L}或载剂以不同剂量静脉施用。由胶原酶破坏毛细血管引起的渗入脑实质的血液体积在损伤后24小时测量。此时,血液从脉管系统排出,移出脑并均质化,均质化脑组织的血红蛋白含量通过与标准曲线比较来定量。

[0161] 相较于仅用载剂处理的小鼠,FXa^{I16L}处理以剂量响应方式减少小鼠的血肿体积。结果示于图3A,其中“*”指示在p值<0.05的统计学显著性。预估ED₅₀=3.05μg/kg。每组测试的动物范围是7-15。图3B显示相较于载剂,与剂量相关的血肿体积减少百分比。

[0162] 使用与小鼠所用类似的方法,在雄性Sprague Dawley大鼠中诱导ICH。胶原酶注射后15分钟,向大鼠静脉施用不同剂量的FXa^{I16L}、100U/kg的促凝血组合物因子8抑制剂旁路活性(FEIBA)或仅载剂。基于脑血红蛋白含量的血肿体积在损伤后2小时测定。

[0163] 相较于仅用载剂处理的大鼠,FXa^{I16L}处理可减少大鼠的血肿体积。结果示于图4A,其中“*”指示在p值<0.05的统计学显著性。图4B显示相较于载剂,与剂量相关的血肿体积减少百分比。尽管不如小鼠显著,但剂量响应的趋势明显。

[0164] 除非本文另有定义,与本发明相关使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数项包括复数且复数项应包括单数。一般,与本文所述细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白及核酸化学和杂交相关使用的命名法以及其技术为本领域熟知并常用。

[0165] 本发明的方法和技术一般根据本领域熟知的常规方法进行,如多个一般和更特定参考文献所述,所述参考文献在本说明书中引用和讨论,除非另有说明。参见例如Sambrook J.&Russell D.《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第3版,纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), (2000);Ausubel等,《精编分子生物学实验指南:最新分子生物学实验指南方法汇编》(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology),约翰威利父子出版公司(Wiley,John&Sons,Inc.) (2002);Harlow和Lane《使用抗体:实验室手册》(Using Antibodies:A Laboratory Manual),纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(1998);和Coligan等,《精编蛋白科学实验指南》(Short Protocols in Protein Science),约翰威利父子出版公司(2003),其通过引用纳入本文。酶反应和纯化技术根据厂商说明书进行,如本领域通常所完成或如本文所述。与本文所述分析化学、合成有机化学、医疗和药物化学相关使用的命名法以及其实验室过程和技术为本领域熟知并常用。

[0166] 本文引用的所有出版物、专利、专利申请或其它文献通过引用全文纳入本文以用于所有目的,相同程度就好像各单独出版物、专利、专利申请或其它文献独立表示成通过引用纳入以用于所有目的。

[0167] 本说明书和权利要求中,单词“包含(comprise)”或变化形式如“comprises”或“comprising”应理解成指纳入规定整数或整数组,但不排除任何其它整数或整数组。

序列表

<110> 辉瑞公司
 <120> 治疗脑内出血的组合物和方法
 <130> PC072056A
 <150> US 61/931,071
 <151> 2014-01-24
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
1           5           10           15
Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
           20           25           30
Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
           35           40           45
Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
           50           55           60
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
65           70           75           80
Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
           85           90           95
Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
           100          105          110
Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
           115          120          125
Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
           130          135          140
Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
145          150          155          160
Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
           165          170          175
Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly
           180          185          190
Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
  
```

195	200	205
Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe	Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln	
210	215	220
Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu		
225	230	235
240		
Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu		
245	250	255
Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu		
260	265	270
Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val		
275	280	285
Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu		
290	295	300
Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp		
305	310	315
320		
Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met		
325	330	335
Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr		
340	345	350
Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His		
355	360	365
Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr		
370	375	380
Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln		
385	390	395
400		
Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln		
405	410	415
Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe		
420	425	430
Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys		
435	440	445
Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg		
450	455	460
Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu		
465	470	475
480		
Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys		
485		

<210> 2

<211> 1560

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

gactttgctc cagcagcctg tcccagtgag gacagggaca cagtactcgg ccacacatg 60
gggcgcccac tgcacctcgt cctgctcagt gcctccctgg ctggcctcct gctgctcggg 120
gaaagtctgt tcatccgcag ggagcaggcc aacaacatcc tggcgagggt cacgagggcc 180
aattcctttc ttgaagagat gaagaaagga cacctcgaag gagagtgcag ggaagagacc 240
tgctcatacg aagaggcccg cgaggctctt gaggacagcg acaagacgaa tgaattctgg 300
aataaataca aagatggcga ccagtgtag accagtcctt gccagaacca gggcaaagt 360
aaagacggcc tcggggaata cacctgcacc tgtttagaag gattcgaagg caaaaactgt 420
gaattattca cacggaagct ctgcagcctg gacaacgggg actgtgacca gttctgccac 480
gaggaacaga actctgtggt gtgctcctgc gcccgcgggt acacctggc tgacaacggc 540
aaggcctgca ttcccacagg gcctacccc tgtgggaaac agacctgga acgcaggaag 600
aggtcagtgg cccaggccac cagcagcagc ggggaggccc ctgacagcat cacatggaag 660
ccatatgatg cagccgacct ggaccccacc gagaaccctt tcgacctgct tgacttcaac 720
cagacgcagc ctgagagggg cgacaacaac ctcaccagga tcgtgggagg ccaggaatgc 780
aaggacgggg agtgtccctg gcaggccctg ctcatcaatg aggaaaacga gggtttctgt 840
ggtggaacca ttctgagcga gttctacatc ctaacggcag cccactgtct ctaccaagcc 900
aagagattca aggtgagggt aggggaccgg aacacggagc aggaggagg cggtgaggcg 960
gtgcacgagg tggagggtgt catcaagcac aaccggttca caaaggagac ctatgacttc 1020
gacatcgccg tgctccggtc caagacccc atcaccttcc gcatgaacgt ggcgcctgcc 1080
tgctccccg agcgtgactg ggccgagtcc acgctgatga cgcagaagac ggggattgtg 1140
agcggcttcg ggcgcacca cgagaagggc cggcagtcca ccaggctcaa gatgctggag 1200
gtgccctacg tggaccgcaa cagctgcaag ctgtccagca gttcatcat caccagaac 1260
atgttctgtg cgggctacga caccaagcag gaggatgcct gccaggggga cagcgggggc 1320
ccgcacgtca cccgcttcaa ggacacctac ttcgtgacag gcatcgtcag ctggggagag 1380
ggctgtgccc gtaaggggaa gtacgggatc tacaccaagg tcaccgctt cctcaagtgg 1440
atcgacaggt ccatgaaaac caggggcttg cccaaggcca agagccatgc cccggaggtc 1500
ataacgtcct ctccattaaa gtgagatccc actcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560

```

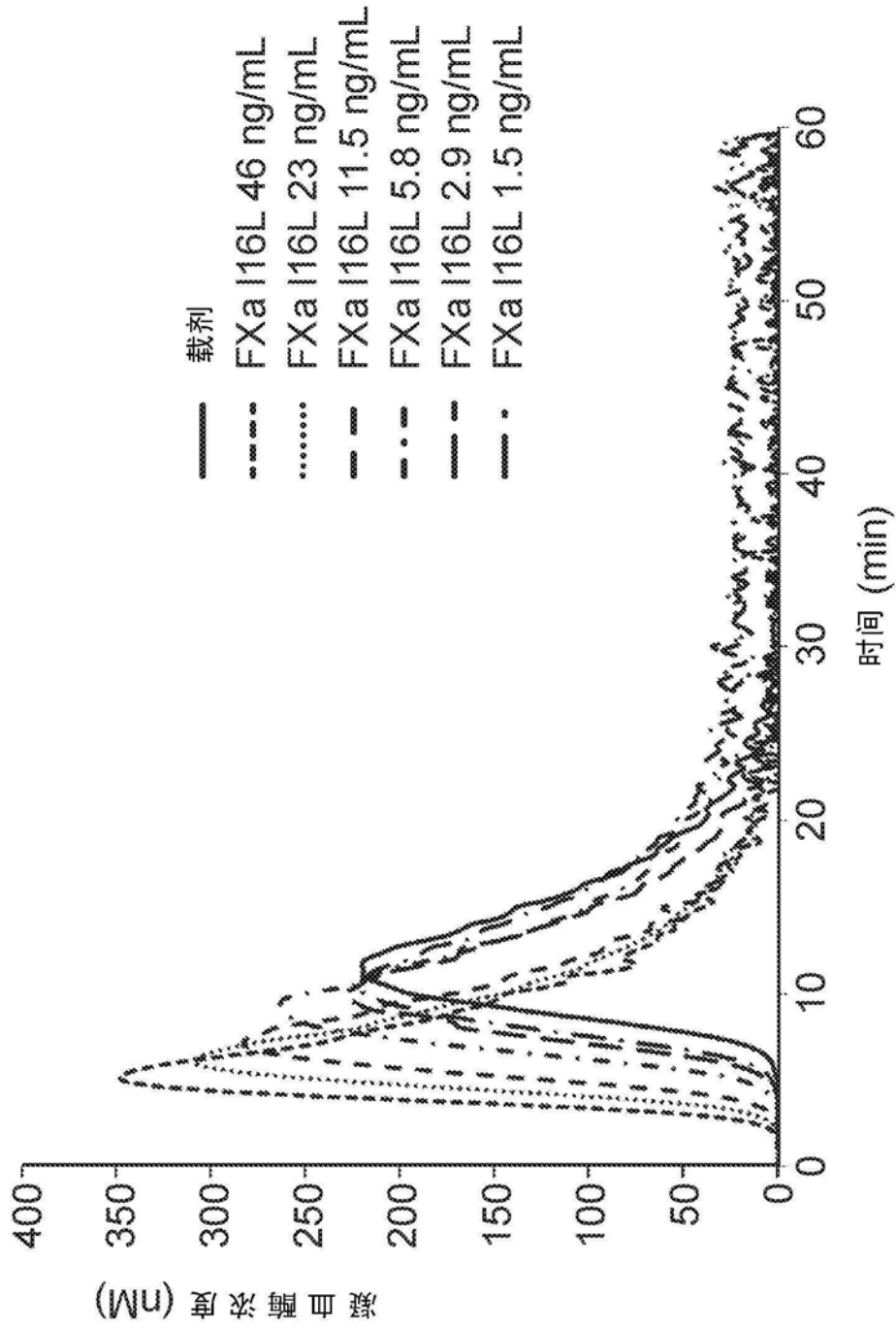


图1A

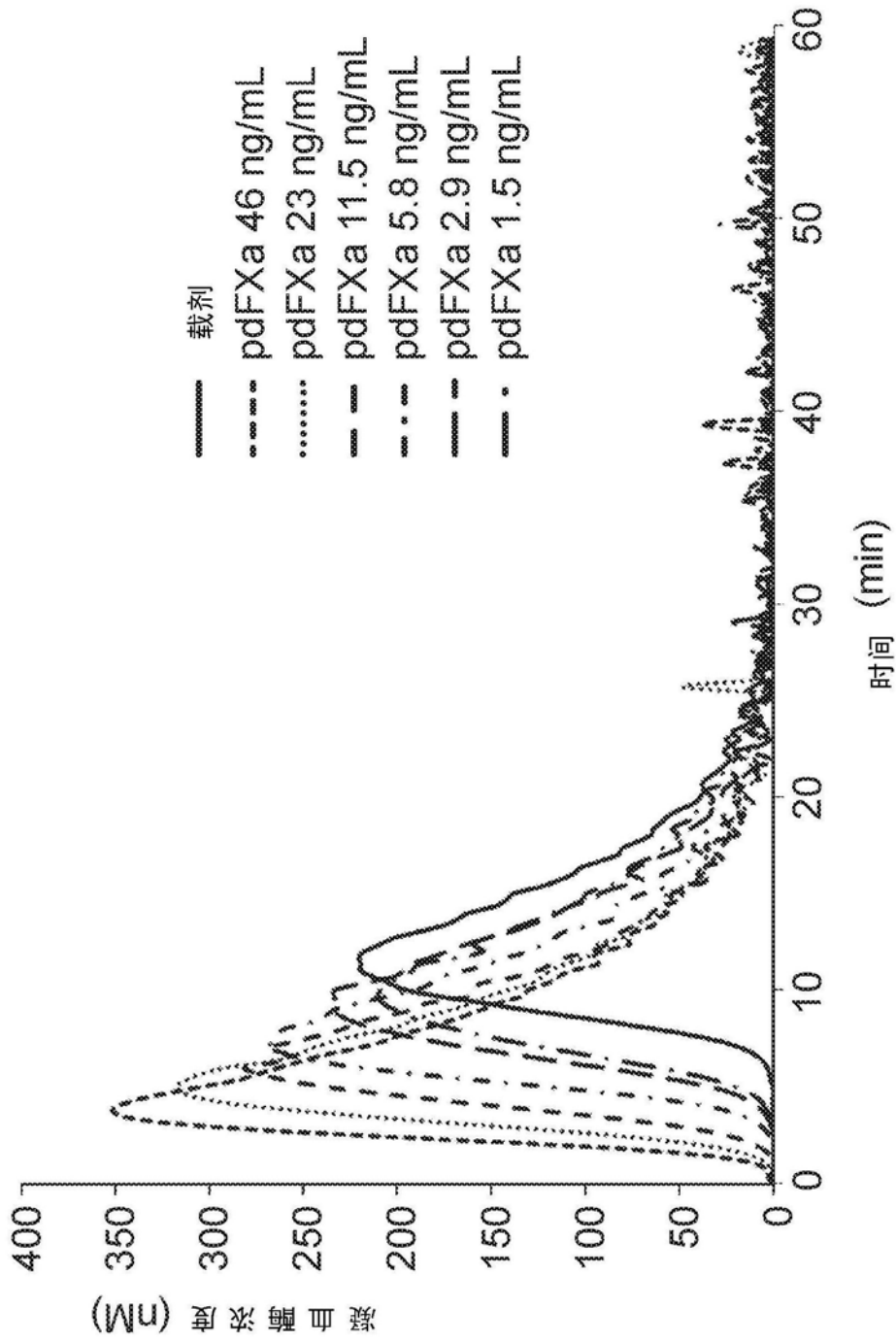


图1B

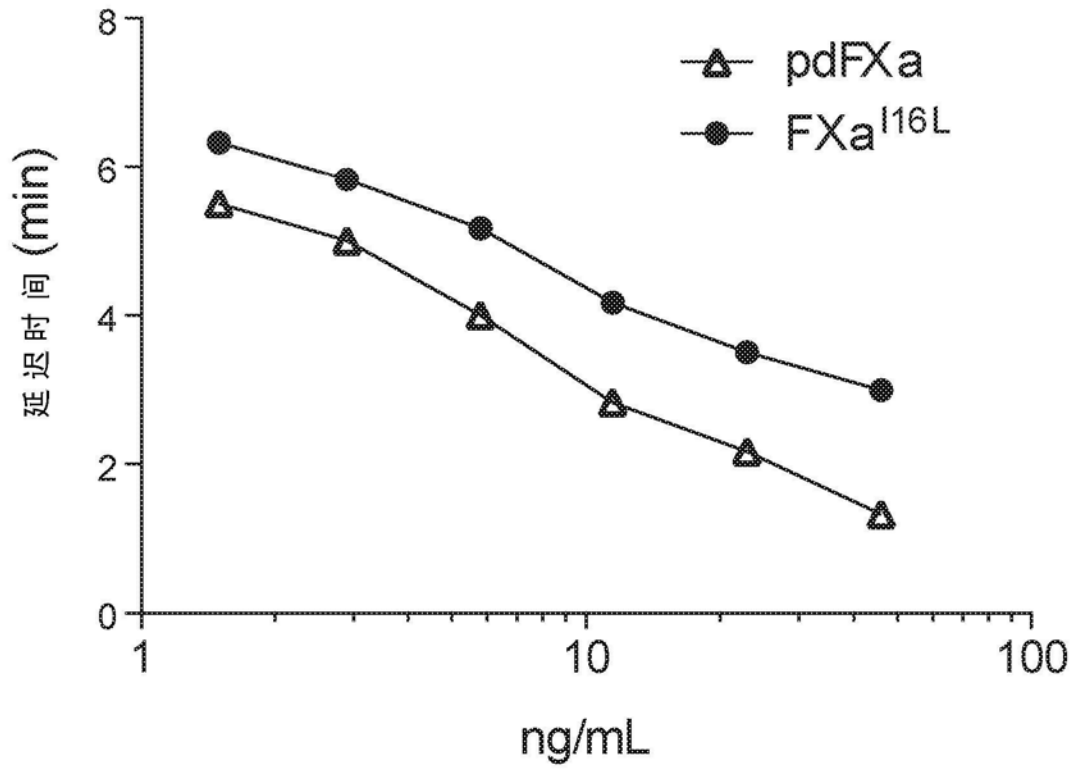


图1C

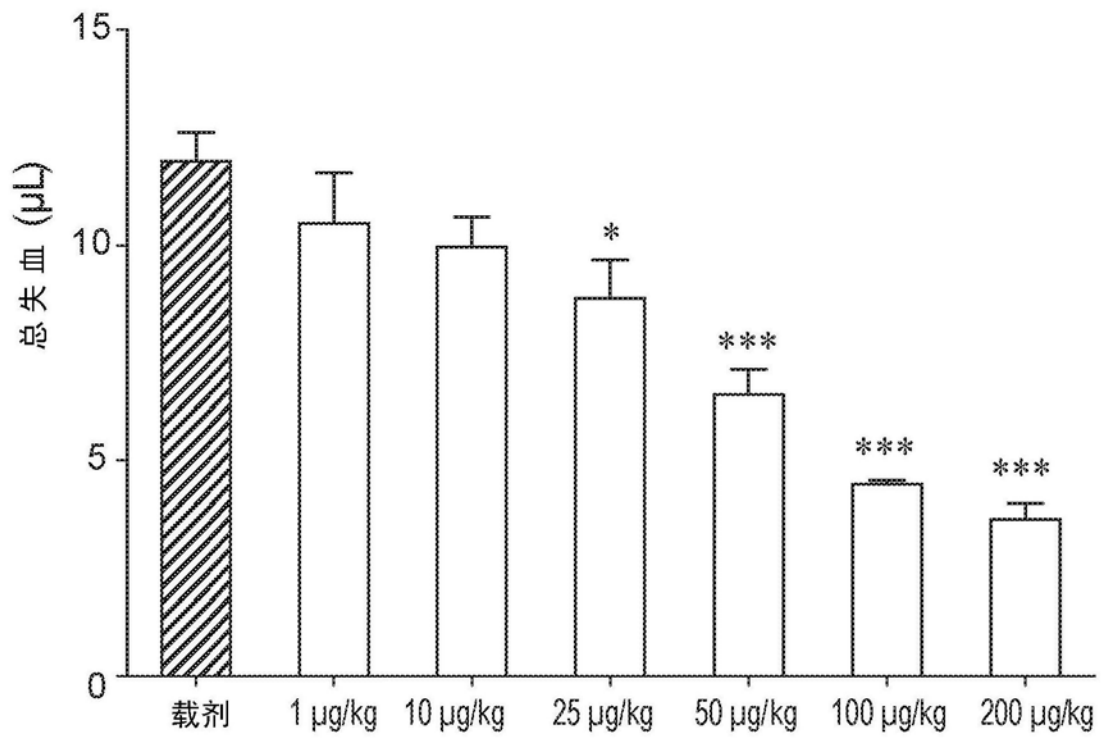


图2A

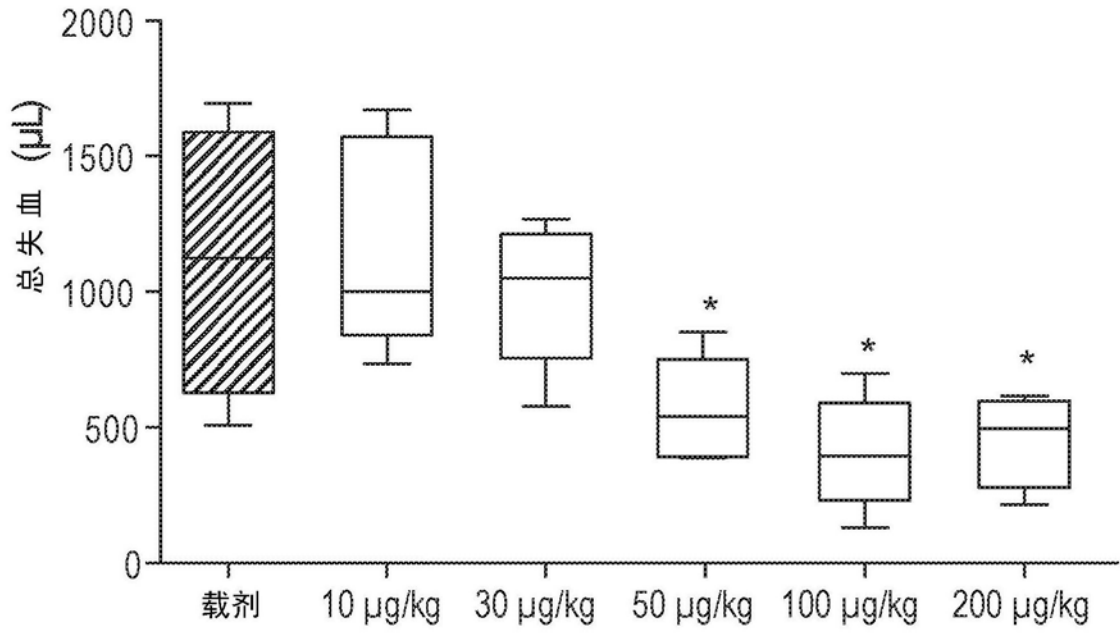


图2B

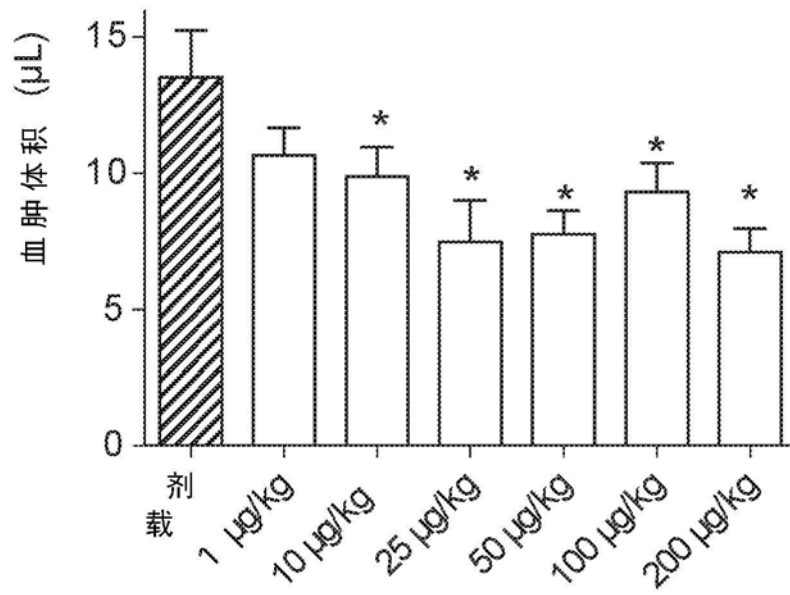


图3A

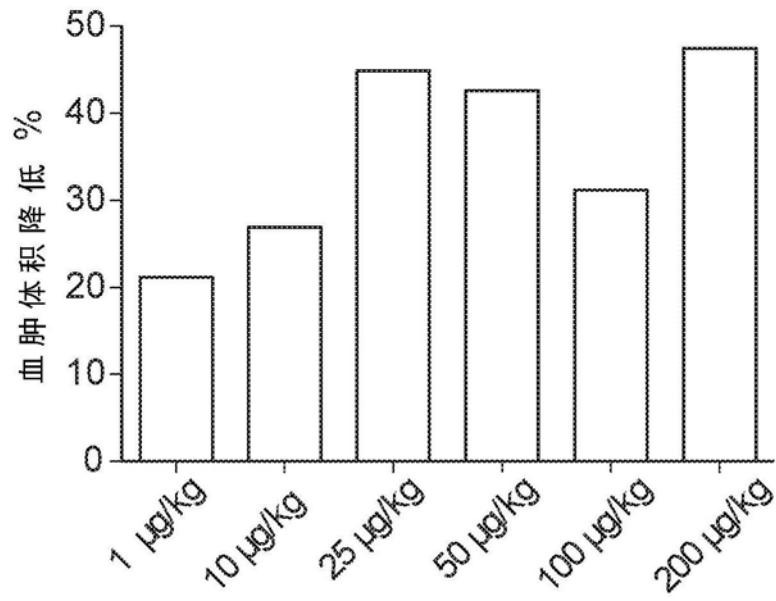


图3B

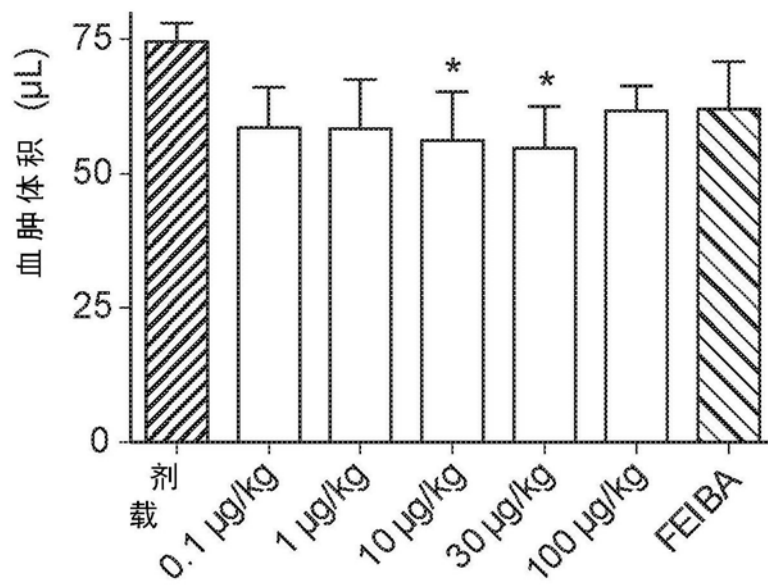


图4A

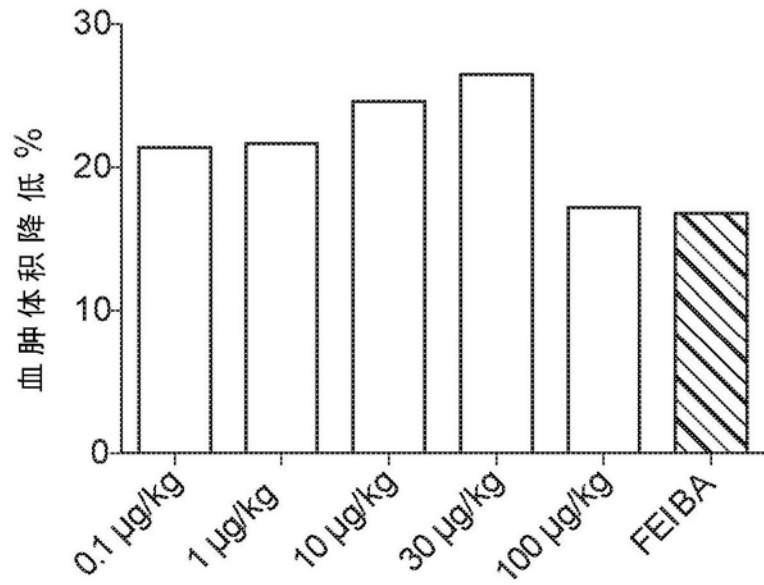


图4B

人因子X前蛋白 (SEQ ID NO:1)

```

1 MGRPLHLVLL SASLAGLILL GESLFIRREQ ANNILARVTR ANSFLEEMKK GHLEECMEE
61 TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGQDC ETSPCQNGK CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN
121 CELFTRKLLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN GKACIPTGPY PCGKQTLERR
181 KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLLDF NQTQPERGDN NLTRIVGGQE
241 CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE
301 AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP ACLPERDWAEE STLMTQKTGI
361 VSGFGRTHEK GRQSTRLLKML EVPNVDNRNSC KLSSSFIITQ NMFCAGYDTK QEDACQGDSS
421 GPHVTREKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE
481 VITSSPLK

```

图5

人因子X前蛋白 cDNA (SEQ ID NO:2)

1 GACTTTGCTC CAGCAGCCTG TCCAGTGAG GACAGGGACA CAGTACTCGG CCACACCATG
 61 GGGCGCCAC TGCACCTCGT CCTGCTCAGT GCCTCCCTGG CTGGCCTCCT GCTGCTCGGG
 121 GAAAGTCTGT TCATCCGCAG GGAGCAGGCC AACAAATCC TGGCGAGGGT CACGAGGGCC
 181 AATTCCTTTC TTGAAGAGAT GAAGAAAGGA CACCTCGAAA GAGAGTGCAT GGAAGAGACC
 241 TGCTCATACG AAGAGGCCCG CGAGGTCITT GAGGACAGCG ACAAGACGAA TGAATTCTGG
 301 AATAAATACA AAGATGGCGA CCAGTGTGAG ACCAGTCCTT GCCAGAAACA GGGCAAATGT
 361 AAAGACGGCC TCGGGGAATA CACCTGCACC TGTTAGAAG GATTCGAAGG CAAAAACTGT
 421 GAATTATTCA CACGGAAGCT CTGCAGCCTG GACAACGGGG ACTGTGACCA GTTCTGCCAC
 481 GAGGAACAGA ACTCTGTGGT GTGCTCCTGC GCCCGCGGGT ACACCCCTGGC TGACAACGGC
 541 AAGGCCCTGCA TTCCCACAGG GCCCTACCCC TGTGGGAAAC AGACCCCTGGA ACGCAGGAAG
 601 AGGTCAGTGG CCCAGGCCAC CAGCAGCAGC GGGGAGGCCC CTGACAGCAT CACATGGAAG
 661 CCATATGATG CAGCCGACCT GGACCCACCC GAGAACCCCT TCGACCTGCT TGACTTCAAC
 721 CAGACGCAGC CTGAGAGGGG CGACAACAAC CTCACCAGGA TCGTGGGAGG CCAGGAATGC
 781 AAGGACGGG AGTGTCCCTG GCAGGCCCTG CTCATCAATG AGGAAAACGA GGGTTTCTGT

continued

图6

841 GGTGGAACCA TTCTGAGCGA GTTCTACATC CTAACGGCAG CCCACTGTCT CTACCAAGCC
901 AAGAGATTCA AGGTGAGGGT AGGGGACCGG AACACGGAGC AGGAGGAGGG CGGTGAGGCG
961 GTGCACGAGG TGGAGGTGGT CATCAAGCAC AACCGTTCA CAAAGGAGAC CTATGACTTC
1021 GACATCGCCG TGTCCGGCT CAAGACCCCC ATCACCTTCC GCATGAACGT GGCGCCTGCC
1081 TGCCTCCCG AGCGTGACTG GGCCGAGTCC ACGCTGATGA CGCAGAAGAC GGGGATTGTG
1141 AGCGGCTTCG GCGGCACCCA CGAGAAGGC CGGCAGTCCA CCAGGCTCAA GATGCTGGAG
1201 GTGCCCTACG TGGACCGCAA CAGCTGCAAG CTGTCCAGCA GCTTCATCAT CACCCAGAAC
1261 ATGTTCTGTG CCGGCTACGA CACCAAGCAG GAGGATGCCCT GCCAGGGGGA CAGCGGGGGC
1321 CCGCACGTCA CCCGCTTCAA GGACACCTAC TTCGTGACAG GCATCGTCAG CTGGGGAGAG
1381 GGCTGTGCC GTAAAGGGAA GTACGGGATC TACACCAAGG TCACCCGCTT CCTCAAAGTGG
1441 ATCGACAGGT CCAATGAAAAC CAGGGGCTTG CCCAAGGCCA AGAGCCATGC CCCGGAGGTC
1501 ATAACGTCTT CTCCATTAAA GTGAGATCCC ACTCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

图6续