



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0070163
(43) 공개일자 2016년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/36 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/36 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7014735
(22) 출원일자(국제) 2014년11월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년06월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/063898
(87) 국제공개번호 WO 2015/066700
국제공개일자 2015년05월07일
(30) 우선권주장
61/899,544 2013년11월04일 미국(US)
61/944,915 2014년02월26일 미국(US)

(71) 출원인
더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린
스트리트 1111 12층
더 스크립스 리서치 인스티튜트
미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 노스 토리 파
인 로드 10550
(72) 발명자
폰 트리갈스키, 안네트
미국 92037 캘리포니아주 라 줄라 헤이븐허스트
플레이스 6121
게일, 앤드류
미국 92126 캘리포니아주 샌 디에고 볼린 스트리
트 10174
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 출혈 또는 응고성 저하와 관련된 상태의 치료 또는 예방용 요법

(57) 요약

본 출원은 일반적으로 이를 필요로 하는 개체에서 출혈 및/또는 응고성 저하를 예방하거나 치료하기 위한 방법, 및 이러한 방법에 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다. 상기 방법은 FVa, 바람직하게는 APC 내성 FVa(예를 들면, 수퍼FVa)를 단독으로 또는 FVIIa, 바람직하게는 rhFVIIa(예를 들면, NovoSeven® 또는 향상된 활성 또는 반감기를 갖는 다른 FVIIa)와 조합하여 투여함을 포함한다. 조합하여 투여된 경우, FVa 및 FVIIa는 이를 필요로 하는 대상체, 예를 들면, 혈우병과 같은 유전 장애 또는 후천적 출혈 장애 또는 출혈성 뇌졸중 또는 쇼크, 외상, 수술 또는 월경 곤란증과 같은 출혈 또는 응고성 저하와 관련된 다른 상태를 갖는 대상체 또는 FVIII 또는 FIX와 같은 응고촉진제에 대한 억제 항체를 생성하거나 직접 Xa 또는 직접 트롬빈 억제제 또는 신규한 경구 항응고제(NOAC)와 같은 항응고 약물의 과용량을 투여했거나 원인 불명 출혈을 입증한 개체에서 출혈 또는 응고성 저하를 치료하거나 예방하기 위해 사용될 때 상승작용적 이점을 유도한다. 또한, 본 발명은, 예를 들면, APC 과생산(예를 들면, 중증 손상 및/또는 출혈성 쇼크를 통해) 또는 APC 또는 다른 항응고제 요법의 결과로, APC-관련 출혈을 예방하고, 치료하거나 역전시키기 위해, 예를 들면, 염증성 장애 또는 패혈증 질환을 치료하는데 수퍼FVa의 단독 또는 FVIIa 또는 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제와의 병용 사용에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/0021 (2013.01)

A61K 9/0073 (2013.01)

Y10S 514/802 (2013.01)

Y10S 514/958 (2013.01)

(72) 발명자

그리핀, 존, 에이취.

미국 92014 캘리포니아주 텔 마르 보퀴타 드라이브
13924

모스니어, 로랑

미국 92123 캘리포니아주 샌 디에고 하존 애비뉴
8662

명세서

청구범위

청구항 1

인자 Va(FVa)의 유효량을 단독으로 또는 FVa와 조합하여 투여될 때 임의로 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 유도하는 인자 VIIa(FVIIa) 또는 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제와 함께 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키기 위한 방법 또는 치료 레지멘.

청구항 2

인자 Va(FVa)의 유효량을 단독으로 또는 FVa와 조합하여 투여될 때 임의로 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 유도하는 인자 VIIa(FVIIa) 또는 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제와 함께 투여함을 포함하는, 출혈 관련 질환 또는 상태를 갖거나 이를 발병시킬 위험이 있는 개체에서 유해한 출혈을 예방하거나 치료하기 위한 방법 또는 치료 레지멘.

청구항 3

APC-매개되거나 APC-유도되거나 APC-관련 출혈을 치료하거나 억제하기 위해 인자 Va(FVa)를 단독으로 또는 인자 VIIa(FVIIa) 또는 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제와 함께 사용하는 방법으로서, APC가 내성적으로 생성되거나 외생적으로 투여되는, 방법.

청구항 4

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa가 단독으로 투여되는, 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 투여된 FVa가 ^{수퍼}FVa인, 방법.

청구항 6

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa가 경구, 주사(예를 들면, 피하, 정맥내 또는 근육내), 주입, 흡입 또는 국소로부터 선택된 수단으로 투여되는, 방법.

청구항 7

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa 및 FVIIa가 조합하여 투여되는, 방법.

청구항 8

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa 및 FVIIa가 경구, 주사(예를 들면, 피하, 정맥내 또는 근육내) 또는 주입, 흡입 또는 국소로부터 선택된 수단으로 투여되는, 방법.

청구항 9

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, 인자 XI, 인자 XII, 프레칼리크레인, 고분자량 키니노겐(HMWK), 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 VIIIa, 인자 IX, 인자 X, 인자 XIII, 인자 H, 신선 동결 혈장 및 폰 빌레브란트 인자로부터 선택된 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 처리 대상체가 APC-관련되거나 APC-유도되거나 APC-매개된 출혈을 갖거나 발병시킬 위험에 있는, 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 APC-관련되거나 APC-유도되거나 APC-매개된 출혈이 항응고제, 예를 들면, APC 또는

합성 소분자 및 생물 제제의 투여에 기인하는, 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 APC-관련되거나 APC-유도되거나 APC-매개된 출혈이 출혈성 뇌졸중 또는 쇼크, 외상, 수술 또는 월경 곤란증에 기인하는, 방법.

청구항 13

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료될 개체가 비정상적 출혈과 관련된 유전적 장애를 갖는, 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 유전적 장애가 혈우병인, 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 유전적 장애가 하나 이상의 혈우병 A, 혈우병 B, 폰 빌레브란트병 및 혈우병 C를 포함하는, 방법.

청구항 16

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체가 후천적 응고 장애를 갖는, 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 후천적 응고 장애가 응고 인자 또는 혈액 응고 인자, 예를 들면, 인자 VIII, 폰 빌레브란트 인자, 인자 IX, V, XI, XII 및 XIII에 대한 자가면역의 반복 투여 결과; 또는 간 질환, 임의로 응고 인자의 감소된 합성 또는 항응고제, 예를 들면, 직접 Xa 또는 트롬빈 억제제 또는 다른 신규한 경구 항응고제 (NOAC)의 준임상 용량, 임상 용량 또는 과용량과 관련된 것에 의해 유도된 것과 같은 지혈 장애인, 방법.

청구항 18

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 개체가 비정상 출혈을 나타내거나 월경 곤란증, 출혈성 뇌졸중, 외상, 수술 또는 다른 침습성 절차의 결과로 출혈 위험이 있거나 원인 불명 출혈을 나타내는, 방법.

청구항 19

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa 및 FVIIa가 동일 조성물에 함유되는, 방법.

청구항 20

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa 및 FVIIa가 상이한 조성물에 함유되는, 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 인자 VIIa이 PCC 농축물(예를 들면, FEIBA, 3-인자 PCC 또는 4-인자 PCC); 또는 인자 VII, II, IX 및/또는 X (및/또는 이들의 활성 형태)를 함유하는 활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물(aPCC)에 함유되는, 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa 및 FVIIa가 동시에 투여되는, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, FVa 및 FVIIa가 별도로 투여되는, 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 개별 투여가 동시에 또는 상이한 시간에 수행될 수 있고, 어느 하나의 순서로 수행될

수 있는, 방법.

청구항 25

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, FVa 및 FVIIa가 투여될 때 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진하거나 트롬빈 생성에 대한 APC의 효과를 역전시킴으로써 출혈 및/또는 강화된 응고의 치료 또는 예방에 대한 상승 효과를 유도하는, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 APC 분해에 내성인, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 FVa가 FVa가 상기 하나 이상의 돌연변이가 부족한 다른 것은 동일한 FVa 폴리펩타이드보다 APC에 더욱 내성하도록 하는 하나 이상의 천연 또는 유전적으로 조작된 돌연변이를 함유하는, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 돌연변이 Arg306Gln, Arg506Gln 및 Arg679Gln 중의 하나 또는 모두 및/또는 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 형성하거나 형성하지 않고 위치 609 및 1691에 시스테인 잔기의 도입 및/또는 돌연변이 G1491P, M1736V 및 Ser2183Ala 중의 하나 또는 모두를 포함하는 ^{수퍼}FVa인, 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 돌연변이 Arg306Gln, Arg506Gln 및 Arg679Gln 각각을 포함하고, 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 형성하거나 형성하지 않고 위치 609 및 1691에 시스테인 잔기 및/또는 돌연변이 G1491P, M1736V 및 Ser2183Ala 각각을 추가로 포함하는 ^{수퍼}FVa인, 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 FVa APC 내성하도록 하는 하나 이상의 천연 돌연변이 또는 다형성(예를 들면, 라이덴, 캄브리지 또는 홍콩 돌연변이)을 포함하는, 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 천연 돌연변이가 아미노산 위치 306 및 506 중의 하나 또는 둘 다에 존재하는, 바람직하게는 Arg306Gln 및 Arg506Gln인, 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 APC 절단에 내성하도록 하는 위치 306, 506, 679, 1491, 1691, 1736 및 2183으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 돌연변이를 포함하는, 방법.

청구항 33

예방적 또는 치료적 유효량의 FVa 및 FVIIa를 포함하는, 비정상 출혈 또는 응고성 저하를 갖거나 발병시킬 위험이 있는 환자에게 투여하기 위한 조성물.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 조성물이 투여될 때 트롬빈의 생성을 촉진함으로써 출혈 및/또는 응고의 치료 또는 예방에 대한 상승 효과를 유도하는, 조성물.

청구항 35

청구항 33 또는 34에 있어서, 상기 FVa가 APC 분해에 내성인, 조성물.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 FVa가, FVa가 상기 하나 이상의 돌연변이가 부족한 다른 것은 동일한 FVa 폴리펩타이드보다 APC에 더욱 내성하도록 하는 하나 이상의 천연 또는 유전적으로 조작된 돌연변이를 함유하는, 조성물.

청구항 37

청구항 33 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 돌연변이 Arg306Gln, Arg506Gln 및 Arg679Gln 중의 하나 또는 모두 및/또는 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 형성하거나 형성하지 않고 위치 609 및 1691에 시스테인 잔기의 도입 및/또는 돌연변이 G1491P, M1736V 및 Ser2183Ala 중의 하나 또는 모두를 포함하는 ^{수퍼} FVa인, 조성물.

청구항 38

청구항 33 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 FVa가 APC 절단에 내성하도록 하는 하나 이상의 천연 돌연변이 또는 다형성(예를 들면, 라이텐, 캠브리지 또는 홍콩 돌연변이)을 포함하는, 조성물.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 천연 돌연변이가 아미노산 위치 306 및 506 중의 하나 또는 둘 다에 존재하는, 바람직하게는 Arg306Gln 및 Arg506Gln인, 조성물.

청구항 40

청구항 33 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVa가 FVa가 APC 절단에 내성하도록 하는 위치 306, 506, 679, 1491, 1691, 1736 및 2183으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 돌연변이를 포함하는, 조성물.

청구항 41

청구항 33 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 경구, 주사(피하, 정맥내 또는 근육내), 주입, 흡입 또는 국소로부터 선택된 경로로 투여하기에 적합한, 조성물.

청구항 42

청구항 33 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 개체에게 투여될 때, 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진하거나 응고 내성을 복원시키거나 혈전 용해 시간을 증가시키거나 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI)의 활성화를 복원시킴으로써 응고 또는 출혈의 예방에 대한 상승 효과를 유도할 수 있는, 조성물.

청구항 43

청구항 1 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 항섬유소 용해제, 예를 들면, TAFI 및 유도체, 트라넥삼산, 아미노카프로산, 엽실론-아미노카프로산 아미카, 엽실론-아미노카프로산, 아프로티닌 및 이의 조합의 사용을 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 44

청구항 3에 있어서, 상기 APC가 염증성 장애, 패혈증 질환, 상처 치유 또는 핵 방사선에의 노출에 기인하는 질환의 치료에 투여되는, 방법.

청구항 45

청구항 1 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, FVa가 서열번호 4와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 위치 609 및 1691에서 시스테인 잔기 사이의 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 46

청구항 1 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, FVa가 서열번호 4와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하고, 위치 609 및 1691에서 시스테인 잔기 사이의 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 47

청구항 1 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, FVa가 서열번호 4를 포함하고, 위치 609 및 1691에서 시스테인 잔기

사이의 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 48

청구항 1 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, FVIIa가 서열번호 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 49

청구항 1 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, FVIIa가 서열번호 2와 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 50

청구항 1 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, FVIIa가 서열번호 2를 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 51

청구항 1 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, FVa가 서열번호 4를 포함하고, FVIIa가 향상된 생체내 안정성 또는 활성을 포함하는 서열번호 2 또는 이의 변이체를 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 52

^{수퍼}FVa 또는 다른 APC-내성 FVa를 단독으로 또는 NOAC와 조합하여 사용함을 포함하는, 신규한 경구 항응고 약물 (NOAC)과 관련되거나 이에 의해 야기되거나 이에 의해 매개되는 출혈 관련 상태를 예방하거나 치료하기 위한 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 NOAC가 직접 FXa 억제제 및/또는 트롬빈 억제제인, 방법.

청구항 54

청구항 52 또는 53에 있어서, 상기 NOAC가 리바록사반, 아픽사반, 에독사반, 다비가트란 또는 이의 조합인, 방법.

청구항 55

청구항 52 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 혈전성 장애 또는 뇌졸중을 치료하거나 예방하기 위해 사용되는, 방법.

청구항 56

청구항 52 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, KcentraTM의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 57

트롬빈 생성 또는 지혈 가능성을 상승적으로 향상시키기 위해 ^{수퍼}FVa 또는 다른 APC-내성 FVa 및 적어도 하나의 재조합 FVIIa, 재조합 FIXa, 재조합 FXa, 프로트롬빈 복합체 농축물 또는 이의 조합의 병용 사용을 포함하는, 출혈 관련 상태를 치료하기 위한 병용 용법.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 상기 NOAC가 직접 인자 Xa 억제제 및/또는 트롬빈 억제제인, 방법.

청구항 59

청구항 57 또는 58에 있어서, 상기 NOAC가 리바록사반, 아픽사반, 에독사반, 다비가트란 또는 이의 조합인, 방법.

청구항 60

청구항 52 내지 59 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ^{수퍼}FVa 또는 다른 APC-내성 FVa변이체가 NOAC의 준임상 용량, 임상 용량 또는 과용량에 기인하는 출혈을 예방하는, 방법.

청구항 61

청구항 52 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, NOAC로 치료된 환자의 수술의 예방을 포함하여 출혈성 뇌졸중 또는 쇼크, 외상 또는 수술을 치료하거나 예방하기 위해 사용된, 방법.

청구항 62

서열번호 4를 포함하는 FV의 활성화된 형태를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 63

청구항 62의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 64

FV 생산에 적합한 조건하에 청구항 62의 숙주 세포를 배양하고, 임의로 상기한 FV의 활성화 형태를 단리시키고 정제함을 포함하는, FV의 활성화 형태의 제조법 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 이 출원은 미국에 대한 우선권을 주장한다 가출원 번호 2013년 11월 4일자로 출원된 "출혈 또는 응고성 저하와 관련된 상태의 치료 또는 예방을 위한 병용 요법"이라는 제목의 제61/899,544호, 및 미국 가출원 번호 2014년 2월 26일자로 출원된 "출혈 또는 응고성 저하와 관련된 상태의 치료 또는 예방을 위한 병용 요법"이라는 제목의 제61/944,915호, 이 가출원 모두의 내용은 전체가 본원에 참조로 인용된다.
- [0003] 발명에 대한 정부의 권리
- [0004] 본 발명은 국립 보건원(NIH)에 의해 수여된 NIH 보조금 HL021544 및 HL104165하의 정부 지원에 의해 수행되었다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.
- [0005] 발명의 분야
- [0006] 본 출원은 일반적으로 치료학적 유효량의 인자 Va (FVa), 바람직하게는 활성화 단백질 C (APC) 내성 FVa, 예를 들면, ^{수퍼}FVa를 단독으로 또는 인자 VIIa (FVIIa), 바람직하게는 재조합 FVIIa, 보다 바람직하게는 rhFVIIa, 예를 들면, 와 함께 투여하여 이를 필요로 하는 개체에서 출혈 및/또는 응고성 저하를 예방하거나 치료하기 위한 방법 및 이러한 방법에 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다 (NovoSeven(NovoSeven®)), 또는 재조합 FVIIa의 다른 변이체, 예를 들면, 개선된 반감기 또는 증가된 활성을 나타내는 것; 또는 다른 응고 촉진제 또는 프로-지혈제, 여기서 병용은 바람직하게는 이를 필요로 하는 대상체에게 단독으로 투여될 때 FVa 또는 FVIIa 또는 다른 응고 촉진제 또는 프로-지혈제에 비해 트롬빈 생성에 대해 상승 효과를 유발한다. 또한, 본 발명은 과도한 APC 생성 또는 투여에 기인하는 출혈을 치료하거나 예방하기 위한, FVa, 바람직하게는 APC 내성 FVa 단독 또는 FVIIa, 예를 들면, NovoSeven® 또는 이의 다른 변이체, 예를 들면, 개선된 반감기 또는 활성을 포함하는 것, 또는 다른 응고 촉진제 또는 프로-지혈제와 병용하는 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 출혈 장애, 특히 응고 인자에서 선천적 또는 후천적 결핍은 전형적으로 인자 교체에 의해 처리된다. 출혈 장애는 선천적 또는 후천적일 수 있다. 응고 장애는 혈우병, 응고 인자 VIII (혈우병 A) 또는 인자 IX (혈우병 B)의 결핍을 수반하는 열성 X-연결 장애, 및 폰 빌레브란트병(von Willebrand's disease), 폰 빌레브란트 인자의

심각한 결핍을 수반하는 드문 출혈 장애를 포함한다. 혈우병 C는 인자 XI의 결핍에 의한 혈우병의 경증 형태이다. 이것은 일반적으로 무증상이지만, 인자 교체 요법이 수술 중에 필요할 수 있다.

[0008] 후천적 응고 장애는, 혈액 응고 인자, 예를 들면, 인자 VIII (FVIII), 폰 빌레브란트 인자, 인자 (F) IX, V, XI, XII 및 XIII에 대한 억제 항체(종종 "억제제"로서 칭명됨)에 의해 발생될 수 있고; 이러한 억제제는 외생적 주입된 FVIII 또는 FIX에 대해, 또는 자가면역의 설정에서 발생할 수 있다.

[0009] 후천성 응고 장애는 또한 질환 과정의 결과로서 출혈의 이전 병력이 없는 개체에서 발생할 수 있다. 예를 들면, 후천성 응고 장애는 급성 외상, 항응고제의 투여, 감염 또는 간 질환(임의로, 응고 인자의 감소된 합성과 관련된 것)과 같은 지혈 장애로 유발될 수 있고, 이들 모두는 응고 인자의 감소된 합성과 관련된다. 예를 들면, 후천적 응고 장애는 증가된 수준의 가용성 트롬보모듈린 및 이의 단편과 관련된 질환 또는 유전적 돌연변이체에 기인할 수 있다(참조: Langdown J, Luddington RJ, Huntington JA, Baglin TP, A hereditary bleeding disorder resulting from a premature stop codon in thrombomodulin (p.Cys537Stop). Blood. 2014 Sep 18;124(12):1951-6. doi: 10.1182/blood-2014-02-557538), 이의 개시 내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0010] 외상은 45세 미만의 사람의 사망의 주요 원인이고, 출혈은 몇 시간 내에 이러한 사망의 거의 절반을 차지한다(참조: Cothren CC, 등 Worl J Surg 2007; 31:1507-1511, 이의 개시 내용은 명백하게 본원에 참조로 인용된다). 외상성 출혈 및 응고 장애는 중요한 응고 인자 분자인 활성화 (a) FV를 또한 분해하는 단백질 C (PC)의 과도한 활성화에 의해 매개된다(참조: Daniel Frith and Karim Bohi; Curr Opin Crit Care 2012, 18:631-636; 및 Chesebro BB, 등 2009; Shock; 32: 659-665, 이의 개시 내용은 명백하게 본원에 참조로 인용된다). 대량 혈액 성분 수혈 이외에, 이용 가능한 유효한 응고 인자 교체는 없다.

[0011] 출혈 위험의 증가는 또한 다양한 항응고제에 의한 요법을 수용한 환자에서 관찰되고, 출혈 위험을 감소시키는 프로지혈제에 대한 일반적인 미충족 요구 사항이 존재한다. 구체적으로, 인자 Xa (FXa) 또는 트롬빈을 직접 억제하는 신규한 항응고제(NOAC)에 의해 유발되는 출혈에 이용할 수 있는 효과적인 치료법은 없다[1, 2]. NOAC는 점점 심방 세동 설정에서 뇌졸중의 예방 뿐만 아니라 정맥 혈전 색전증의 치료 및 예방에 처방되고 있고, 가까운 미래에 와파린을 대체할 것으로 기대된다. 이는 NOAC가 와파린에 필요한 프로트롬빈 시간에 따라서 빈번한 환자 모니터링 및 용량 조절을 필요로 하지 않고 와파린과 비교하여 적어도 동등한 효능을 입증하기 때문이다[3-8]. 그러나, 와파린과 마찬가지로, 주요 또는 임상 관련 출혈은 NOAC를 사용하는 치료 결과이고, 모두 약 5 내지 15%의 치사율로 약 5%/년의 비율로 출혈을 야기한다[3-8]. 와파린 유도 출혈의 경우, 혈장 제품 또는 프로트롬빈 복합체 농축물(PCC)의 투여는 지혈을 달성하기 위해 유효하지만[9, 10], 현재 이용 가능한 NOAC-유도 출혈에 대한 해독제가 없다. NOAC-관련 출혈 환자에서 혈장 제품 또는 PCC의 개입은 일반적으로 비효과적인 것으로 인식된다. 데이터는 혈장 제품 또는 PCC가 시험관내 지혈 매개변수의 단지 부분적 및 모순적 보정 뿐만 아니라 동물 모델에서 불량하거나 존재하지 않는 출혈 감소를 입증하는 시험관내 연구, 동물 모델 및 건강한 인간 지원자로 제한된다[2]. 또한, 혈우병 환자에서 출혈 조절에 승인된 rhFVIIa (NovoSeven®) 및 억제제의 개입 및 외상성 또는 수술적 출혈에 종종 사용된 오프-라벨[11, 12]은 NOAC- 및 와파린-유도 출혈에 비효과적인 것으로 보인다. 시험관내 지혈 매개변수의 단지 최소한의 보정은 NOAC에 노출된 건강한 지원자에서 rhFVIIa (NovoSeven®)으로 달성되었고[13], 와파린 받은 피부 생검으로 치료된 환자에서 지혈에 대한 어떤 효과도 존재하지 않았다[14].

[0012] 따라서, 출혈 및 출혈 에피소드의 적절한 예방 또는 조절의 위험은 이러한 부류의 약물의 주요 관심사로 남아 있다. NOAC와 관련된 출혈을 역전시키기 위한 임상 옵션의 결핍은 신규한 특정 해독제의 조사에 박차를 가했다. 이와 같이, 직접적 트롬빈 억제제 관련 aPTT 연장[15] 및 다비가트란-특이적 인간화 모노클로날 항체 단편 aDabi-Fab를 단축시키는 트롬빈 이중 돌연변이 W215A/E217A의 반전 특성은 최근에 보고되었다[16]. 직접적 FXa를 결합하는 능력을 보유하는 촉매적 불활성 FXa는 건강한 지원자에서 임상 개발 중이다[17].

[0013] 또한, NOAC의 흔한 부작용으로서 출혈을 위한 효과적이고/이거나 승인된 치료는 현재 없다. 혈장 제품 rhFVIIa도 프로트롬빈 복합체 농축물도 출혈을 구조하기 위한 임상적 효능이 입증되지 않았지만, 이용 가능한 임의의 다른 치료법이 부재하는 절망적 상황에서 자주 사용된다.

[0014] 또한, 다른 심각한 출혈 상황, 예를 들면, 출혈성 뇌졸중 또는 쇼크, 심각한 손상 또는 수술주변에 효과적인 치료법이 없다

[0015] 혈우병은 각각 혈우병 A 또는 B로서 공지된 FVIII 또는 FIX의 결핍 중 하나를 특징으로 한다. 심각한 혈우병은 자발적 관절, 근육 및 두개내 출혈을 나타내는 반면, 경증 또는 중등도 혈우병 출혈은 일반적으로 단지 지혈과

제, 예를 들면, 외성 또는 수술로 발생한다. 1960년대 이전에, 혈우병 환자는 일반적으로 유아로서 사망했다. 안전한 응고 인자 제제의 출현으로, 평균 수명은 현재 일반 집단(1)에 필적할 만하고, 증가하는 고령화 혈우병 환자의 수는 혈우병성 관절염의 부담과 같은 출혈에 고유의 동반 질환을 감소시키기 위한 응고 인자 교체 요법의 전략을 최적화하기 위한 새로운 요구를 드러냈다.

[0016] 혈우병 A 및 FVIII 억제제 환자를 위한 통상적인 요법은 재조합 FVIII 또는 응고 촉진 바이패스제, 예를 들면, FEIBA 또는 재조합 FVIIa와 같은 치료제에 의해 달성된다. 효과적이지만, 요법이 비효과적일도록 하는 억제 항체의 개발은 일반적인 발생이다. 또한, FVIII 억제제 환자 치료용 치료제로서 FVIIa 및 FEIBA는 매우 짧은 반감기를 갖고, 따라서 빈번한 정맥내 투여를 필요로 한다.

[0017] 사실, 혈우병 환자의 약 30%는 외생적 투여된 FVIII (2)에 대한 중화성 억제 항체를 개발하고, 이는 그것이 환자가 FVIII- 또는 FIX-치료에 비반응성이도록 하기 때문에 요법의 가장 치명적인 합병증이다. 억제제를 근절시키기 위한 면역 관용 유도(ITI)는 최대 2년(평균 6개월)이 걸릴 수 있고, 케이스 (3)의 단지 약 70%에서 성공적이다. 이 시간 동안 및, ITI가 성공하지 못한 경우에는 평생 환자는 치명적인 출혈에 취약하고, 삶의 질이 낮은 (4) 쇠약 관절염을 발병시킬 위험이 높다.

[0018] FVIIa-기반 응고 인자 제제는 손상 부위에서 내생적 FVIIIa-, FIXa-, 및 FXIa-매개된 트롬빈 증폭의 필요성의 바이패싱을 통해 출혈을 구조하여 억제제를 사용하는 환자를 치료하기 위해 개발되었다. 초생리적 수준에서, FVIIa는 조직 인자(TF)-의존성 경로를 통해 또는 혈소판 (5, 6) 표면상의 TF와 독립적으로 FX의 직접적인 활성화에 기초하는 트롬빈 생성을 가속화한다.

[0019] 불행하게도, FVIIa-기반 바이패스제에 의한 치료는 차선으로 잔류하고, 임상 현실에서 종종 실패이다 (4, 7, 8). 이는 보다 지속적인 트롬빈 형성을 제공하기 위한 새로운 치료 전략을 매우 바람직하게 하고, 몇가지 새로운 응고제의 조사에 영감을 주어왔다. 이들은 증가된 촉매 활성 및 반감기 (9-11)를 갖는 신규한 FVIIa 변이체, FX (12)를 결합시키고 활성화시키는 개선된 능력을 갖는 유전자 조작된 FIX-분자, 및 FVa를 프로트롬비나제 복합체 (13, 14)에 결합시 활성화되는 유전자 조작된 발효균형 FX 변이체를 포함한다. 본 발명자들을 포함하는 연구팀은 최근 다른 매력적인 대안적 바이패싱 전략으로서 "FVa 활동 확대"를 제안했다. FVa는 프로트롬비나제 복합체의 중요한 보조 인자이고, 트롬빈 생성 속도를 약 10,000배 (15) 향상시키지만, 활성화 단백질 C (APC) (16)에 의해 빠르게 불활성화된다. ^{수퍼}FVa는 Arg506, Arg306 및 Arg679에서 모두 3개의 APC 절단 부위의 돌연변이 및글리코실화 부위 Ser2183에서 A2 및 A3 도메인을 연결하는(A2-SS-A3) 도메인간 이황화 결합(His609Cys-Glu1691Cys) 및 Ser2183Ala (16)의 돌연변이에 기인하는 Asn2181에서 글리코실화 부위의 제거에 기인하여 APC-불활성화 내성이기 때문에, 이는 "FVa 활동 확대"의 이상적 분자이다. 이 분자는 다른 FVa 변이체와 비교할 때 FVIII-결핍 혈장에서 우수한 응혈 촉진성을 나타냈고, 혈우병 A 마우스 모델에서 출혈을 조절할 수 있었다(참조: von Drygalski A, 등 JTH 2014; 12:363-372), 뿐만 아니라 후천적 혈우병 A 마우스 모델에서, 여기서 항-FVIII 항체는 출혈을 유도하기 위해 야생형 마우스에 주입한다. ^{수퍼}FVa의 효과는 rhFVIIa와 결합될 때 증강되었다.

[0020] 본 발명은 이러한 요구를 해결하고, 출혈 관련 상태를 치료하기 위한 새로운 요법 및 치료 레지멘을 제공한다.

[0021] 발명의 요약

[0022] 안전하고 편리하고 효과적인 출혈 장애를 치료하기 위한 개선된 치료제 및 치료 레지멘이 필요하다. 또한, 예를 들면, APC의 과발현 또는 과활성화 또는 항응고제, 예를 들면, APC의 투여 결과로, APC 관련 출혈을 효과적으로 치료하거나 예방하는 요법 및 치료 조성물이 필요하다. 본 발명은 이러한 문제를 완화하기 위한 이러한 개선된 치료 레지멘 뿐만 아니라 이에 사용하기 위한 신규 조성물을 제공한다.

[0023] *아래에* 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 혈우병에서 지혈을 강력하게 정상화하는 유전자 조작된 FVa-변이체 ^{수퍼}FVa가 프로헤모스테틱 생물학을 위한 기준에 적합하고, 심각한 손상 또는 NOAC의 치료와 관련된 출혈에 도움이 될 수 있다는 가설을 세웠다. ^{수퍼}FVa는 A2 및 A3 도메인 사이의 유전자 조작된 이황화 결합(Cys609-Cys1691)(FV (A2-SS-A3))에 기인하여 야생형 FVa와 비교하여 향상된 특이적 활성을 갖고, 이의 생물학적 활성은 활성화 단백질 C (APC) 절단 부위 (Arg506/306/679Gln)의 돌연변이 및 Ser2183Ala의 돌연변이에 기인하는 Asn2181에서 글리코실화 부위의 제거로 강화된다. 이러한 변형 결과로, ^{수퍼}FVa는 다른 FVa 변이체와 비교하여 혈우병 혈청에서 우수한 지혈 특성으로 APC 불활성화에 매우 내성이고, 혈우병 마우스 모델에서 효율적으로 출혈을 방지하는 것으로 밝혀졌다(참조: von Drygalski A, 등, Improved hemostasis in hemophilia by means of an

engineered factor Va mutant. J Thromb Haemost; 2014; 12:363-372). 또한, 억제제를 갖는 혈우병 혈장에서, ^{수퍼}FVa는 놀랍게도 트롬빈 생성 및 혈전 용해의 연장에 대해 rhFVIIa와 함께 상승 효과를 나타냈다(참조: Bhat V. 및 von Drygalski A, 등; 미공개 데이터). ^{수퍼}FVa는 또한 인간 APC-처리된 혈장의 지혈 매개변수를 복원하는데 효율적이었지만 rhFVIIa 또는 PCC는 그렇지 않았고, 야생형 마우스에서 꼬리 클립 또는 간 열상 후 APC-유도 출혈 및 사망을 억제할 수 있었다(참조: von Drygalski A, 등; An engineered FVa prevents bleeding induced by anticoagulant wild-type Activated Protein C. PLOS One; 2014 Aug 15; 9(8):e104304 (doi: 10.1371/journal.pone.0104304. eCollection 2014)). 본원에서 논의된 바와 같이, ^{수퍼}FVa는 NOAC로 스파이크된 인간 혈장에서 우수한 지혈 특성 뿐만 아니라 NOAC로 처리된 마우스에서 상당한 출혈 감소를 입증했다. 또한, 본원에 제공된 바와 같이, ^{수퍼}FVa의 프로헤모스테틱 특성은, 예를 들면, 와 배합될 때 향상되었다 PCC 또는 rhFVIIa 또는 FIXa 또는 FXa.

- [0024] 이러한 관찰을 기준으로 하여, 본 발명자들은 혈우병 및 APC-유도 출혈에서 강력하게 지혈을 정상화하는 유전자 조작된 FVa-변이체로서 ^{수퍼}FVa가 잠재적으로 FXa 억제제와 같은 NOAC에 의해 유발된 출혈을 향상시킬 수 있는 프로헤모스테틱 생물학을 위한 기준에 적합하다고 결론지었다. 따라서, 하나의 국면에서, 본 발명은 ^{수퍼}FVa 또는 다른 APC-내성 FVa를 단독으로 또는 NOAC와 함께 사용함을 포함하는, 신규한 경구 항응고 약물(NOAC)과 관련되거나, 이에 의해 유도되거나 이에 의해 매개되는 출혈 관련 상태를 예방하거나 치료하기 위한 요법을 제공한다.
- [0025] 추가로, 이에 기초하여, 본 발명은 부분적으로 과도한 APC 생성 또는 APC 또는 다른 항응고제 투여 또는 합성 소분자 및 생물학적 제제에 기인하는 출혈을 치료하거나 예방하기 위한, FVa, 바람직하게는 APC 내성 FVa의 단독 또는 FVIIa, 예를 들면, NovoSeven® 또는 이의 다른 변이체, 예를 들면, 향상된 반감기 또는 활성을 갖는 것과 병용 사용에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은, 예를 들면, 염증성 장애, 패혈증 질환, 상처 치유 및/또는 핵 방사선에 노출로 인한 질환을 갖는 개체에서 APC-관련 출혈을 역전시키거나 억제하기 위해 ^{수퍼}FVa의 단독 또는 FVIIa와의 병용 투여에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 목적은 강화된 혈액 응고를 필요로 하는 대상체, 예를 들면, 유전적 및 후천적 출혈 장애, 또는 억제제를 갖는 혈우병, 또는 지혈 장애, 또는 원인불명 출혈 대상체를 치료하기 위한, FVa 단독 사용 또는 FVIIa와의 병용 사용을 포함하는 신규 치료 레지멘을 제공하는 것이다. 바람직하게는, FVa는 하나 이상의 천연(예를 들면, 를 함유한다 그것이 APC에 내성하도록 (돌연변이가 부족한 다른 동일한 FVa 폴리펩타이드보다 APC에 대해 더욱 내성하도록) 하는 라이덴, 캄브리지 또는 홍콩 돌연변이) 또는 유전적으로 조작된 돌연변이. 천연 돌연변이는 바람직하게는 아미노산 위치 306 및 506, 바람직하게는 Arg306Gln 및 Arg506Gln 중의 하나 또는 둘 다에 있다. 유전적으로 조작된 돌연변이는 바람직하게는 위치 306, 506, 679, 1491, 1691, 1736 및 2183의 위치에서 발생하고, FVa가 APC 절단에 내성하도록 한다.
- [0028] 보다 바람직하게는, FVa는 C609와 C1691 사이에 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 형성하거나 형성하지 않고 FVa가 특히 APC 내성하도록 하는 특이적 돌연변이, 즉, 돌연변이 R306Q, R506Q, H609C, R679Q, 결실 810-1489, G1491P, E1691C, M1736V 및 S2183A 중 하나 또는 모두를 갖는 "^{수퍼}FVa"이다. 가장 바람직하게는, ^{수퍼}FVa는 C609와 C1691 사이에 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 형성하거나 형성하지 않고 (wt FVa에 대해) 아미노산 810-1489의 결실을 갖거나 갖지 않고 306Q, R506Q, H609C 및 R679Q에서 돌연변이 및/또는 G1491P, E1691C, M1736V 및 S2183A에서 돌연변이를 갖는다.
- [0029] 또한, 바람직하게는, FVIIa는 rhFVIIa (NovoSeven®) 또는 FVIIa의 다른 변이체, 바람직하게는, 예를 들면, 돌연변이 유발 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 수용성 중합체와 같은 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 잔기에의 결합 결과로 향상된 반감기 및/또는 활성을 갖는 것이다. 본 조합 및 이러한 조합을 사용하는 치료 레지멘은 상승적으로 트롬빈의 생성을 촉진함으로써 혈우병과 같은 출혈 또는 응고성 저하 장애를 치료하기 위한 현재 이용가능한 치료 레지멘에 비해 응혈, 즉 응고에 대한 상승 효과를 유도하는 것으로 밝혀졌다.
- [0030] 보다 구체적으로, 본 발명의 목적은 FVIIa를 사용하거나 사용하지 않고 유효량의 FVa의 투여를포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 혈액 응고를 촉진하거나 출혈을 감소 또는 예방하는 방법을 제공하는 것이다. 바람직하게는, 상대적 투여량은 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진함으로써 응혈 또는 응고에 대한 상승 효과를

유도한다. (본 조합이 응고성 저하 또는 출혈을 치료하거나 예방하는데 사용되는 예시적 징후의 치료를 위한 예시적인 예상 투여 계획은 *아래에* 나타낸다).

[0031] 본 발명의 다른 목적은 유효량의 FVa를 단독으로 또는 FVIIa와 함께 투여함으로 이루어지는, 이를 필요로 하는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이고, 즉, 여기서, 투여되는 유일한 혈액 응고 촉진제는 FVa, 바람직하게는 ^{수퍼} FVa 또는 다른 프로테아제 내성 FVa, 및 FVIIa이다.

[0032] 본 발명의 다른 목적은 FVa, 바람직하게는 (매우 APC 내성이도록 돌연변이된) ^{수퍼} FVa를 단독으로 또는 조합하여 트롬빈 생성을 상승적으로 촉진시키는 rhFVIIa (NovoSeven®)와 함께 또는 다른 FVIIa와 배합하여, 임의로 다른 활성제 또는 응고 촉진제 또는 프로-지혈제, 예를 들면, 와 조합하여 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다 FXI, FXII, 프레칼리크레인, 고분자량 키니노젠 (HMWK), FV, FVII, FVIII, FVIIIa, FIX, FX, FXIII, FH, 신전 동결 혈장 및 폰 빌레브란트 인자 또는 상기 나열된 인자의 활성화 형태 또는 비-항응고제 황산화 다당류(NASP), 예를 들면, 펜토산 폴리설페이트(PPS), 푸코이단, N-아세틸-헤파린(NAH), N-아세틸-de-O-황산화-헤파린(NA-de-o-SH), de-N-황산화-헤파린(De-NSH), de-N-황산화-아세틸화-헤파린(De-NSAH), 펄로오테이트-산화 헤파린(POH), 화학적으로 황산화된 라미나린(CSL), 화학적으로 황산화된 알긴산(CSAA), 화학적으로 황산화된 펙틴(CSP), 텍스트란 설페이트(DXS) 및 헤파린 유도 올리고당(HDO).

[0033] 본 발명의 다른 목적은 유효량의 FVa를 단독으로 또는 FVIIa, 바람직하게는 ^{수퍼} FVa 및 rhFVIIa와 함께 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 출혈을 예방하거나 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이고, 여기서 FVa는 단독으로 또는 FVIIa와 함께 경구, 주사(피하, 정맥내 또는 근육내), 주입, 흡입 또는 국소로부터 선택된 수단으로 투여된다.

[0034] 본 발명의 다른 구체적인 목적은 비정상적 출혈과 관련된 유전적 장애를 갖는 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 출혈과 관련된 유전적 장애, 예를 들면, 혈우병 또는 보다 구체적으로 혈우병 A, 혈우병 B 및 폰 빌레브란트병을 갖는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0035] 본 발명의 다른 목적은 이를 필요로 하는 개체, 예를 들면, 혈액 응고 인자(예를 들면, FV, FVIII, 프로트롬빈, 트롬보모듈린, 단백질 C 및 단백질 S, 항트롬빈, 호모시스테인 또는 지단백질(a))가 부재하고, 정상 수준 미만으로 존재하거나 유전적 돌연변이 또는 다형에 기인하는 손상된 기능을 갖는 정상 수준으로 존재하는 유전적 응고 장애, 또는 후천적 응고 장애, 예를 들면, 혈액 응고 인자, 예를 들면, FVIII, 폰 빌레브란트 인자, 인자 IX, V, XI, XII 및 XIII에 대해 자가면역을 부여하는 장애; 또는 억제제를 갖는 혈우병; 또는 간 질환에 의해 유발되는 지혈 장애, 임의로 응고 인자의 감소된 합성과 관련된 지혈 장애; 월경 곤란증; 또는 원인 불명의 출혈을 갖는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0036] 본 발명의 다른 구체적 목적은 이를 필요로 하는 개체에서 출혈을 예방하거나 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이고, 여기서 개체는 외상, 수술, 치과 절차 또는 다른 침습 절차의 결과로 출혈을 갖거나 출혈 위험에 있거나 원인 불명 출혈을 나타낸다. 치료된 대상체는, 예를 들면, 출혈성 뇌졸중 또는 쇼크, 외상, 수술 또는 월경 곤란증에 기인하는 APC-관련되거나 APC-유도되거나 APC-매개된 출혈을 가질 수 있거나 발병시킬 위험에 있다.

[0037] 본 발명의 다른 목적은 상승적 유효량의 FVa 및 FVIIa의 투여를 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이고, 여기서 상기 FVa 및 FVIIa는 동일한 조성물 또는 상이한 조성물에 함유되고, 동시에 상이한 시간에 어느 하나의 순서로 함께 또는 별도로 투여된다. 전형적으로, 투여는 응고 및 트롬빈 생성에 대한 목적하는 상승 효과를 달성하기 위해 동시에 또는 근방에서 수행된다. 상승작용을 위해, 투여는 치료 방법에 사용된 FVIIa 및 특정 FVa, 바람직하게는 본 발명에 따르는 수퍼FVa에 대한 생체내 반감기 ($T_{1/2}$)에 의존한다. 수퍼FVa 또는 다른 FVa, 예를 들면, FVa 변이체, 예를 들면, 향상된 안정성 또는 반감기를 포함하는 것에 대한 $T_{1/2}$ 은 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. FVIIa에 대한 $T_{1/2}$ 은 약 2.5시간이다. 이 $T_{1/2}$ 에 기초하고 이의 예상되는 $T_{1/2}$ 에 기초하여, ^{수퍼} FVa는 바람직하게는 FVIIa의 4x $T_{1/2}$ 이내에, 바람직하게는 FVIIa의 1x $T_{1/2}$ 이내에, 즉 약 10시간 마다 내지 약 2.5시간 투여로 투여된다.

[0038] 본 발명의 구체적인 목적은 유효량의 FVa를 단독으로 또는 FVIIa와 함께 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는

개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다. FVa는 바람직하게는 APC 분해에 내성이고, 예를 들면, FVa는 FVa가 상기한 하나 이상의 돌연변이가 부족한 다른 동일한 FVa 폴리펩타이드보다 APC에 더욱 내성하도록 하는 하나 이상의 자연 발생 또는 유전적으로 조작된 돌연변이를 함유한다. 더욱 더 바람직하게는, FVa는 돌연변이 Arg306Gln, Arg506Gln 및 Arg679Gln 중의 하나 또는 모두 및/또는 위치 609 및/또는 1691에 시스테인 잔기의 도입(이들 시스테인 잔기 사이에 분자내 도메인간 이황화 브릿지 존재 및 부재)를 포함하는 ^{수퍼}FVa이고/이거나 돌연변이는 하나 이상의 천연 돌연변이(예를 들면, 를 포함하고 FVa가 APC 내성하도록 하는 라이덴 돌연변이), 예를 들면, 위치 506에서 치환 돌연변이, 바람직하게는 Arg506Gln 및/또는 FVa 돌연변이는 위치 306(예를 들면, 캄브리지 치환 Arg306Thr, 홍콩 치환 Arg306Gly 또는 바람직하게는 Arg306Gln), 506, 679, 및 1736로부터 선택된 하나 이상의 부위에 FVa가 APC 절단에 내성하도록 하는 돌연변이 및/또는 Ser2183Ala 돌연변이의 돌연변이에 기인하여 Asn2181에서 글리코실화 부위의 제거를 포함한다. 가장 바람직하게는, ^{수퍼}FVa는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일하거나 동일한 서열을 포함하고, 위치 609 및 1691에서 시스테인 잔기 사이의 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 포함한다.

[0039] 또한, FVIIa는 야생형 또는 변이체 hFVIIa, 예를 들면, NovoSeven® 또는 돌연변이 발생 및/또는 생체내 반감기 또는 활성을 증가시키는 잔기, 예를 들면, 수용성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 등의 부착 결과로 향상된 활성 및/또는 반감기를 포함하는 다른 FVIIa 변이체일 수 있다. 바람직하게는, FVIIa는 서열번호 2와 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일하거나 동일한 서열을 포함한다.

[0040] 본 발명의 다른 목적은 이를 필요로 하는 개체에서 혈액 응고를 촉진시키는 본 치료 레지멘에 사용하기 위한 조성물, 즉, 비정상적 출혈 또는 응고성 저하를 갖거나 발병시킬 위험이 있는 환자에게 투여하기 위한 조성물을 제공하는 것이고, 이 조성물은 FVIIa를 포함하거나 포함하지 않고 예방적 또는 치료적 유효량의 FVa를 포함한다. 바람직하게는, 상기 FVa 및 FVIIa가 조합하여 투여되는 경우, 이들은 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진함으로써 출혈의 치료 또는 예방 및/또는 강화된 응고에 대한 상승 효과를 유발한다. 특별한 구현예에서, 조성물은, 이를 필요로 하는 개체에게 투여될 때, 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진하거나 응고의 내성을 복원시키거나 혈전 용해 시간을 증가시키거나 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI)의 활성화를 복원시킴으로써 응고 또는 출혈의 예방에 대한 상승 효과를 유발할 수 있다.

[0041] 바람직한 구현예에서, 조성물 중의 FVa는 APC 분해에 내성인 것이고, 예를 들면, 이는 FVa가 상기 하나 이상의 돌연변이가 부족한 달리 동일한 FVa 폴리펩타이드보다 APC에 더욱 내성하도록 하는 하나 이상의 천연 또는 유전적으로 조작된 돌연변이를 함유한다. 바람직하게는, FVa는 돌연변이 Arg306Gln, Arg506Gln 및 Arg679Gln 중의 하나 또는 모두를 포함하는 ^{수퍼}FVa이고/이거나 두 시스테인 잔기 사이에 삽입된 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 포함하거나 포함하지 않고 위치 609 및/또는 1691에 시스테인 잔기를 포함하도록 돌연변이되고/되거나, 하나 이상의 천연 돌연변이(예를 들면, 를 함유하고 FVa가 APC 내성하도록 하는 라이덴 돌연변이), 예를 들면, 라이덴 돌연변이는 (성숙 단백질 중에서) 506 번호가 매겨진 아미노산 위치, 바람직하게는 Arg506Gln에 존재하고/하거나 이는 위치 306, 506, 679, 및 1736으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 FVa가 APC 절단에 내성하도록 하는 돌연변이를 포함하고/하거나 FVa는 글리코실화를 변경하는 돌연변이, 예를 들면, Ser2183Ala 돌연변이를 함유한다. 가장 바람직하게는, ^{수퍼}FVa는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일하거나 동일한 서열을 포함하고, 위치 609 및 1691에서 시스테인 잔기 사이의 분자내 도메인간 이황화 브릿지를 포함한다.

[0042] 다시, FVIIa는 바람직하게는 rhFVIIa, 예를 들면, 야생형 또는 향상된 활성 및/또는 반감기를 포함하는 변이체, 예를 들면, (NovoSeven® 또는 다른 변이체를 포함한다. 바람직하게는, FVIIa는 서열번호 2와 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 이들 조성물은 경구, 주사(예를 들면, 피하, 정맥내 또는 근육내), 주입 또는 국소로부터 선택된 경로에 의한 투여용으로 채택된다.

[0043] 본 발명의 구체적인 목적은 트롬빈 생성 또는 지혈 가능성을 상승적으로 향상시키기 위해 ^{수퍼}FVa 또는 다른 APC-내성 FVa 및 적어도 하나의 재조합 FVIIa, 재조합 FIXa, 재조합 FXa, 프로트롬빈 복합체 농축물, 또는 이의 조합의 병용 사용을 포함하는, 출혈 관련 상태를 치료하기 위한 병용 요법을 제공하는 것이다.

[0044] 본 발명의 다른 구체적인 목적은 임의로 수퍼FVa와 함께 Kcentra TM의 사용을 추가로 포함하여 혈전 장애 및 뇌졸중의 치료 및 예방용으로 최근에 개발된 신규한 경구 항응고 약물(NOAC), 예를 들면, 직접 Xa 억제제, 예를 들면, 리바록사반 및 아픽사반 및 에독사반 또는 이의 조합 뿐만 아니라 직접 트롬빈 억제제, 예를 들면, 다비가트란의 사용에 의해 유도된 출혈을 예방하고/하거나 감소시키는 것이다.

- [0045] 관련 국면에서, 본 발명은 ^{수퍼}FVa 또는 다른 APC-내성 FVa 변이체를 단독으로 또는 공동치료제로서 재조합 FVIIa 또는 다른 프로-지혈제(예를 들면, 를 제공한다 NOAC의 준임상 용량, 임상 용량 및/또는 과용량에 기인하는 출혈의 해독제를 제공하기 위한 3-인자 PCC, 4-인자 PCC, 활성화 PCC, FEIBA, 신선 동결 혈장, FVa, FIXa, FXa).
- [0046] 또한, 본 발명은 ^{수퍼}FVa의 단독 또는 다른 치료제(예를 들면, 재조합 FVIIa 또는 다른 지혈 촉진제(예를 들면, 와 병용 사용을 제공한다 NOAC(예를 들면, 직접 인자 Xa 억제제 및/또는 트롬빈 억제제)로 처리된 환자에서 수술의 예방을 포함하여 출혈성 뇌졸중 또는 쇼크, 외상 또는 수술과 같은 다른 징후에서 출혈을 예방하거나 치료하기 위한, 3-인자 PCC, 4-인자 PCC, 활성화 PCC, FEIBA, 신선 동결 혈장, FVa, FIXa, FXa).
- [0047] 본 발명의 다른 목적은 출혈 에피소드 및 출혈 관련 상태의 치료 및 예방하는데 있어서 제제 단독에 대해 향상된 효능을 제공하기 위해 ^{수퍼}FVa 또는 다른 FVa 변이체와 함께 FVIIa; FX 및 FXa; FIX 및 FIXa; 프로트롬비나제 복합체 농축물(PCC); 3-인자 PCC; 4-인자 PCC; 활성화 PCC; 인자 8 바이패싱 활성(FEIBA); 신선 동결 혈장; 및 FV 또는 FVa를 포함하는 상승작용 조합 및 이의 용도를 제공하는 것이다.
- [0048] 다른 목적은 NOAC를 함유하는 혈장에서 rhFVIIa 또는 프로트롬빈 복합체 농축물 및 ^{수퍼}FVa의 상승작용을 입증하는 것이다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 4를 포함하는 FV의 활성화 형태를 코딩하는 단리된 핵산 분자; 단리된 핵산, 예를 들면, 서열번호 4를 포함하는 숙주 세포; 및 FV 생산에 적합한 조건하에 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 임의로 상기한 FV의 활성화 형태를 단리하고 정제함을 포함하는, FV의 활성화 형태의 재조합 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0050] 도면의 상세한 설명
- [0051] **도 1a** 및 **b**는 FVIII-결핍 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타내는 실험을 함유한다. 트롬빈 생성은 rhFVIIa (NovoSeven®, 25 ng/mL)의 고정 농도의 존재 또는 부재하에 ^{수퍼}FVa의 증가하는 농도로 보충된 FVIII-결핍 혈장에서 ETP 및 피크 높이로서 측정되었다. (a) rhFVIIa의 부재(상부 패널) 또는 존재하(하부 패널)에 ^{수퍼}FVa의 증가하는 농도에서 ETP의 대표적인 예. (b) rhFVIIa의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 ^{수퍼}FVa의 증가하는 농도로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. ^{수퍼}FVa; SFVa. 오차 막대는 평균(n≥5)의 표준 오차를 나타낸다.
- [0052] **도 2a** 및 **b**는 FVIII-결핍 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타내는 실험 결과를 함유한다. 트롬빈 생성은 ^{수퍼}FVa (0.59 µg/ml)의 고정 농도의 부재 또는 존재하에 rhFVIIa (NovoSeven®)의 증가하는 농도로 보충된 FVIII-결핍 혈장에서 ETP 및 피크 높이로서 측정되었다. (a) ^{수퍼}FVa의 부재(상부 패널) 또는 존재하(하부 패널)에 rhFVIIa의 증가하는 농도에서 ETP의 대표적인 예. (b) ^{수퍼}FVa의 부재(검은색 곡선) 및 존재하(적색 곡선)에 rhFVIIa의 증가하는 농도로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). 내생적 트롬빈 잠재력; ETP, ^{수퍼}FVa; SFVa. 오차 막대는 평균(n≥5)의 표준 오차를 나타낸다.
- [0053] **도 3a** 및 **b**는 항-FVIII 항체(억제제)를 갖는 정상 인간 혈장(NHP)에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타내는 실험 결과를 함유한다. 트롬빈 생성은 1.25 µg/ml 항-인간 FVIII-항체가 보충된 정상 인간 혈장에서 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)로서 측정되었다. (a) 고정 용량의 rhFVIIa (NovoSeven®, 25ng/ml)의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa에 의한 트롬빈 생성. (b) 고정 용량의 ^{수퍼}FVa 농도의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 rhFVIIa에 의한 트롬빈 생성. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. ^{수퍼}FVa; SFVa. 오차 막대는 평균(n≥5)의 표준 오차를 나타낸다.
- [0054] **도 4a** 및 **b**는 선천적 FVIII-결핍 및 고역가 항-FVIII 항체(억제제)를 갖는 환자의 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타내는 실험 결과를 함유한다. 트롬빈 생성은 (a) UCSF 혈우병 치료 센터에서 2명의 환자로부터 억제제를 갖는 혈장 샘플 또는 (b) 3명의 상이한 환자로부터 억제제를 갖는 상업적 혈장 샘플에서 ETP(상부 패

널) 및 피크 높이(하부 패널)로서 측정되었다. ETP는 ^{수퍼}FVa 또는 rhFVIIa, 또는 이의 조합의 2개의 상이한 농도에서 측정되었다. 억제제 역가는 BU로 표현된다. 폴링된 NHP는 대조군으로 기능했다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. 정상 인간 혈장; NHP. BU; 베테스다 단위. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0055] 도 5a 및 5b는 선적적 FVIII-결핍 및 급성 관절 출혈을 위해 rhFVIIa(NovoSeven®)로 처리된 고역가 항-FVIII 항체를 갖는 환자의 혈장에서 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타내는 실험 결과를 함유한다. 혈장 샘플은 각각 64 U/mL (환자 A) 및 32 U/mL (환자 B)의 BU-역가를 갖는 2명의 환자로부터 90 µg/kg에서 rhFVIIa의 주입 직전(오픈 원) 및 주입 후 5분(오픈 사각형)에 수득했다. 트롬빈 생성은 혈장 샘플에 생체의 첨가된 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa에 의한 ETP(상부패널) 또는 피크 높이(하부 패널)로서 측정되었다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. BU; 베테스다 단위. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0056] 도 6은 GMA8015 항-FVIII의 베테스다 역가를 함유한다. FVIII 억제 활성은 문헌[참조: Barrow and Lollar, JTH, 2006]에 기재된 프로토콜에 따르는 변형된 니이메겐 베테스다 검정에 따라서 측정했다. 50% FVIII 활성은 0.031µg/mL의 GMA8015로 잔류하고 있었다. 이는 32,300 BU/mg의 GMA8015를 유도한다.

[0057] 도 7은 동종형 항체를 포함하거나 포함하지 않는 정상 인간 혈장에서 트롬빈 생성을 나타낸다. 트롬빈 생성은 곡선하 면적(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)로서 표현된, 1.25 µg/mL 동종형 항체의 존재 또는 부재하에 정상 폴링된 인간 혈장 중의 내생적 트롬빈 잠재력(ETP)으로서 폴링된 정상 인간에서 측정되었다. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0058] 도 8a 및 8b는 트롬빈 생성을 측정하는 실험 결과를 함유한다. 패널 A 및 B에서의 실험에서, 이는 rhAPC의 존재하에 A) 정상 인간 혈장을 사용하고 B) rhFVa 또는 rh^{수퍼}FVa로 보충된 무린 Balb/c 혈장을 사용하여 각각 측정되었다. 트롬빈 생성은 곡선하 면적(AUC)(n=4-6)으로서 나타냈다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p-값 < 0.001)을 나타낸다.

[0059] 도 9a-c는 aPTT 보정을 나타낸다. 패널 A)의 실험에서, aPTT 응고 시간은 a) 10 nM rhAPC (n=4) 존재하에 증가하는 농도의 rhFVa 또는 rh^{수퍼}FVa의 존재하에 인간 혈장에서 측정되었고, 패널 B)에서 aPTT 응고 시간은 10 nM rhAPC 및 1nM rh FVa 변이체에서 단일 데이터 포인트로서 표시되고, 패널 C)에서 aPTT 응고 시간은 rhFVa 변이체(n=10)의 존재하에 무린 혈장에서 표시되었다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p-값 < 0.001)을 나타낸다.

[0060] 도 10은 Balb/C 마우스로 재조합 무린 APC의 정맥내 주사 후 FVa 변이체에 의한 aPTT 보정을 나타낸다. 마우스는 생리 식염수 또는 rmAPC(0.5mg/kg)를 정맥내 주사했다. 2분 후에 혈액을 안와후 수집하였고, 전혈 APTT를 즉시 측정했다. APC를 주사한 두 그룹의 마우스에서 전혈은 두 변이체에 의한 APTT 보정 정도를 측정하기 위해 ^{수퍼}FVa 또는 wt FVa(오픈 삼각형 1 U/mL, 오픈 원 0.5 U/mL, 밀폐된 삼각형 0.05 U/mL)로 생체의 스파이킹했다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p-값 < 0.001)을 나타낸다.

[0061] 도 11a-c는 무린 꼬리 클립 모델에서 ^{수퍼}FVa에 의한 APC-유도 출혈의 보정을 나타내는 실험 결과를 함유한다. 야생형 마우스는 증가하는 용량의 rhAPC 또는 생리 식염수를 정맥내 주사했다. ^{수퍼}FVa는 2개의 농도로 APC 2분 전에 정맥내 주사했다. 꼬리 클립 후 출혈은 µl 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타낸다. 패널 (a)는 20분 동안 혈액 손실을 나타내고, (b) 꼬리 클립을 나타낸 후 1차 10분 및 (c) 2차 10분으로 분류했다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. *는 통계적 유의성(p-값 < 0.05)을 나타낸다.

[0062] 도 12는 꼬리 클립 및 간 열상 후 출혈 패턴의 직접 비교를 나타내는 실험 결과를 함유한다. FVIII-결핍 마우스는 생리 식염수(200 µL) 또는 rhFVIII(50U/kg; 200 µL)을 정맥내 주사하고, 꼬리 클립 또는 간 열상을 실시했다. 야생형 Balb/c 마우스는 기준값의 생리 식염수를 주사했다. 20분 동안 모든 마우스 그룹에서 혈액 손실은 두 모델에서 측정했다.

[0063] 도 13a-c는 간 열상 후 ^{수퍼}FVa의 투여 후 APC-유도 출혈의 보정을 입증하는 실험 결과를 나타낸다. 마우스는 1.25 mg/kg의 생리 식염수 또는 인간 APC 유래 혈장을 정맥내 주사했다. ^{수퍼}FVa를 3.5 mg/kg로 APC 2분 전에 정맥내 주사했다. 간 열상 후 출혈은 µl 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타낸다. 20분 동안 (A) 혈액 손실 및 (b) 생존. (c) 손상 후, 1^차 10분(상부 패널) 및 2^차 10분(하부 패널)로 분류된 혈액 손실. 오차 막대는 SEM을

나타낸다. *는 통계적 유의성(p -값 < 0.01)을 나타낸다. ^APC를 주사한 13마리 마우스 중 4마리가 손상 후 1차 10분 동안 사망했다(오픈 윈). 2차 10분 동안 3마리 추가 마우스가 각각 사망했고(오픈 직사각형), 따라서 하부 패널로부터 제외된다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p -값 ≤ 0.01)을 나타낸다.

- [0064] 도 14a 및 14b는 rhAPC 혈장에 의한 트롬빈 생성의 억제를 나타내는 실험 결과 및 용량 반응을 함유한다. 트롬빈 생성은 증가하는 rhAPC의 존재하에 a) 정상 인간 혈장 및 b) 마우스 혈장에서 측정했다. 트롬빈 생성은 곡선하 면적 AUC로서 나타냈다.
- [0065] 도 15a 및 15b는 aPTT를 나타내는 실험 결과를 함유한다. rhAPC에 의한 혈장 중 aPTT 응고 시간의 연장 및 용량 반응. aPTT는 증가하는 농도의 rhAPC로 보충 후($n=2-5$) a) 정상 인간 혈장 및 b) 마우스 혈장에서 측정했다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.
- [0066] 도 16a 및 16b는 인간 혈장에서 트롬빈 생성의 APC-유도 감소의 구조를 나타낸다. 트롬빈 생성은 rhAPC의 존재하에 a) 곡선하 면적(AUC) 및 b) 피크 높이로서 정상 인간 혈장에서 측정했다. 트롬빈 생성의 구조를 위해, ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa를 단독으로 또는 조합하여 적용했다.
- [0067] 도 17은 정상 인간 혈장에서 항-FVIII 항체의 효과를 연구하기 위해 수행된 혈전 용해 검정 결과를 함유한다. 항-FVIII 항체의 적정은 $5 \mu\text{g/ml}$ 이상의 항체가 혈전 용해 시간을 TAFIa 억제제(CPI) 대조군의 수준으로 감소시키기에 충분했다는 것을 보여주었다.
- [0068] 도 18a 및 18b는 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 항체 농도를 사용하여 FVIII에 대한 억제제를 포함하는 정상 인간 혈장의 혈전 용해에 대한 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 개별적 및 조합 효과를 평가한 혈전 용해 검정 결과를 함유한다. 본원에 제시된 바와 같이, rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa는 개별적으로 각각 $2 \mu\text{g/ml}$ 및 약 $2-5 \mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 항-FVIII 항체로 배양된 정상 인간 혈장에서 혈전 용해 시간의 향상을 나타냈다.
- [0069] 도 19a 및 19b는 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa가 조합하여 사용된 혈전 용해 검정 결과를 함유한다. 본원에 제시된 바와 같이, rhFVIIa의 감소된 농도에서 두 자리 크기로, ^{수퍼}FVa에서 한자리 크기로 정상 혈장 수준으로 향상시키기 위해 혈전 용해 시간을 관찰하여 FVIII에 대한 억제제를 갖는 정상 인간 혈장(NHP)의 혈전 용해 시간을 보정하는데 있어서 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa 둘 다의 상승 효과를 입증한다.
- [0070] 도 20a 및 20b는 리바록사반으로 처리된 NHP 중의 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 상승 효과를 나타낸다. 트롬빈 생성은 200nM 리바록사반의 존재하에 NHP 중의 ETP 및 피크 높이로서 측정하였다. rhFVIIa ($2 \mu\text{g/mL}$) 단독, ^{수퍼}FVa (400nM) 단독, 또는 고정 용량의 rhFVIIa($2 \mu\text{g/mL}$) 및 증가하는 용량의 ^{수퍼}FVa ($6.25 - 400\text{nM}$)의 조합으로 트롬빈 생성의 역전에 대한 효과를 연구했다. (a) 대표적인 실시예. (b) 3-5개의 독립 실험으로부터 조합 결과로서 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). $2 \mu\text{g/mL}$ 의 rhFVIIa는 $90 \mu\text{g/kg}$ 의 주입 후 예상된 혈장 농도에 상응한다. 적색 점은 리바록사반의 부재하에 NHP 중의 ETP를 나타낸다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. 정상 인간 혈장; NHP. ^{수퍼}FVa; ^SFVa. 오차 막대는 평균($n \geq 3$)의 표준 오차를 나타낸다.
- [0071] 도 21a 및 21b는 아픽사반으로 처리된 NHP 중에서 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 상승 효과를 나타낸다. 트롬빈 생성은 200nM 아픽사반의 존재하에 NHP 중에서 ETP 및 피크 높이로서 측정했다. rhFVIIa ($2 \mu\text{g/mL}$) 단독, ^{수퍼}FVa (400 nM) 단독, 또는 고정 용량의 rhFVIIa ($2 \mu\text{g/mL}$) 및 증가하는 용량의 ^{수퍼}FVa의 조합(6.25 내지 400 nM)에 의한 트롬빈 생성의 역전에 대한 효과를 연구했다. (a) 대표적인 실시예. (b) 3-5개의 독립 실험으로부터 조합 결과로서 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). $2 \mu\text{g/mL}$ 의 rhFVIIa는 $90 \mu\text{g/kg}$ 의 주입 후 예상된 혈장 농도에 상응한다. 적색 점은 아픽사반의 부재하에 NHP 중에서 ETP를 나타낸다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. 정상 인간 혈장; NHP. ^{수퍼}FVa; ^SFVa. 오차 막대는 평균($n \geq 3$)의 표준 오차를 나타낸다.
- [0072] 도 22a 및 22b는 리바록사반으로 처리된 NHP에서 ^{수퍼}FVa 및 증가하는 농도의 KcentraTM의 상승 효과를 나타낸다. 트롬빈 생성은 200nM 리바록사반으로 보충된 정상 인간 혈장에서 ETP 및 피크 높이로서 측정되었다. 증가하는 농도(0.08 내지 1.35 U/mL)에서 KcentraTM 단독 또는 ^{수퍼}FVa (50 nM)와의 조합의 트롬빈 생성의 역전에 대한 효

과를 연구했다. (a) 50nM 농도에서 수퍼FVa의 부재(상부 패널) 또는 존재하(하부 패널)에 증가하는 농도의 Kcentra™에서 ETP의 대표적인 예. (b) 수퍼FVa의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 Kcentra™의 증가하는 농도로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). 1.35 U/kg의 Kcentra™는 최고 권장 용량(50 U/kg)의 주입 후 예상된 혈장 농도에 상응한다. 블루 점은 리바록사반의 부재하에 정상 인간 혈장의 ETP를 나타낸다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. ^{수퍼}FVa; ^SFVa. 정상 인간 혈장; NHP. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0073] **도 23a 및 23b**는 아픽사반으로 처리된 NHP에서 ^{수퍼}FVa 및 증가하는 농도의 Kcentra™의 상승 효과를 나타낸다. 트롬빈 생성은 100ng/ml 아픽사반으로 보충된 정상 인간 혈장에서 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)로서 측정되었다. (a) 50nM 농도에서 ^{수퍼}FVa의 부재(상부 패널) 또는 존재하(하부 패널)에 Kcentra™의 증가하는 농도에서 ETP의 대표적인 예. (b) ^{수퍼}FVa의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 Kcentra™로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). 1.35 U/kg의 Kcentra™는 최고 권장 용량(50 U/kg)의 주입 후 예상된 혈장 농도에 상응한다. 블루 점은 아픽사반의 부재하에 정상 인간 혈장의 ETP를 나타낸다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. ^{수퍼}FVa; ^SFVa. 정상 인간 혈장; NHP. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0074] **도 24a 및 24b**는 리바록사반 또는 아픽사반으로 처리된 NHP에서 Kcentra™ 및 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타낸다. 트롬빈 생성은 (a) 200 nM 리바록사반 및 (b) 200 nM 아픽사반의 존재하에 수퍼FVa (1.25 내지 400 nM)의 증가하는 농도와 함께 Kcentra(1.35 U/mL)로 보충된 NHP에서 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)로서 측정되었다. 1.35 U/kg의 Kcentra™는 최고 권장 용량(50 U/kg)의 주입 후 예상된 혈장 농도에 상응한다. 블루 점은 리바록사반 또는 아픽사반의 부재하에 NHP의 ETP를 나타낸다. 블랙 점은 리바록사반 또는 아픽사반의 존재하에 Kcentra(1.35 U/mL) 단독에 의한 NHP의 ETP를 나타낸다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. ^{수퍼}FVa; ^SFVa. 정상 인간 혈장; NHP. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0075] **도 25a, b 및 c**는 ^{수퍼}FVa와 결합된 rhFVIIa의 주사 후 출혈 보정이 FVIII에 의한 출혈 보정과 유사하다는 것을 나타낸다. FVIII-결핍 마우스는 생리 식염수, rhFVIII, 증가하는 용량의 ^{수퍼}FVa, rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa (1단위 = 프로트롬비나제 검정에서 20nM 야생형 FVa의 활성)와 조합된 rhFVIIa를 정맥내 주사했다. 출혈은 꼬리 클립 후 20분 동안 측정했고, μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타냈다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. a) 생리 식염수, rhFVIII 및 증가하는 용량의 ^{수퍼}FVa 또는 rhFVIIa, b) 저용량 또는 c) 중간 용량의 ^{수퍼}FVa 또는 rhFVIIa를 단독으로 및 조합하여 주사한 마우스에서 혈액 손실.

[0076] **도 26a 및 26b**는 NHP 중의 리바록사반의 용량 적정을 나타낸다. 트롬빈 생성은 증가하는 농도의 리바록사반으로 보충된 NHP 중의 ETP 및 피크 높이로서 측정되었다. (a) 대표적인 예. (b) 증가하는 농도의 리바록사반으로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널). 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. 정상 인간 혈장; NHP. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0077] **도 27a 및 27b**는 NHP 중의 아픽사반의 용량 적정을 나타낸다. 트롬빈 생성은 증가하는 농도의 아픽사반으로 보충된 NHP에서 ETP 및 피크 높이로서 측정되었다. (a) 대표적인 예. (b) 증가하는 농도의 아픽사반으로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)의 증가하는 억제. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. 정상 인간 혈장; NHP. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

[0078] **도 28a 및 28b**는 항-FVIII 항체로 스파이킹된 NHP에서 응고 안정화에 대한 rhFVIIa와 결합된 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 나타낸다. 혈전 용해 시간은 항-FVIII-항체로 스파이킹된 NHP에서 트롬빈 유도 피브린 응고 형성 후 t-PA 매개된 섬유소 용해로 측정되었다. (a) 증가하는 농도의 rhFVIIa를 ^{수퍼}FVa (0.37 nM)의 부재(오픈 원) 또는 존재하(오픈 사각형)에 첨가했다. (b) 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa를 rhFVIIa (0.37 nM)의 부재(오픈 원) 또는 존재하(오픈 사각형)에 첨가했다. CPI의 부재(오픈 상향 삼각형) 또는 존재하(오픈 하향 삼각형)에 억제제 없는 NHP의 혈전 용해시간은 대조 실험을 나타낸다. 정상 인간 혈장; NHP. 감자 피경으로부터 카복시펩티다제 억제제; CPI. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

- [0079] 도 29a 및 29b는 ^{수퍼}FVa, rhFVIIa, mFVIIa 및 이의 조합의 주사 후 출혈 보정을 나타낸다. Balb/c 마우스는 FVIII에 대한 항체(0.25 mg/kg)를 정맥내 주사하고, 출혈을 꼬리 클립 후 20분 동안 측정하고, μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타냈다. (a) 혈액 손실은 생리 식염수, 증가하는 용량의 ^{수퍼}FVa 또는 rhFVIIa 및 저농도의 ^{수퍼}FVa와 rhFVIIa의 조합의 정맥내 주사로 측정했다. (b) 혈액 손실은 증가하는 용량의 mFVIIa 및 저농도의 ^{수퍼}FVa와 mFVIIa의 조합의 정맥내 주사로 측정했다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 1 단위 = 프로트롬비나제 검정에서 20nM 야생형 FVa의 활성. NS; 유의성 없음.
- [0080] 도 30은 상이한 농도의 rhFVIIa 또는 mFVIIa의 주사 후 출혈 보정의 비교를 나타낸다. Balb/C 마우스는 FVIII에 대한 항체(0.25 mg/kg)를 정맥내 주사하고, 출혈은 꼬리 클립 후 20분 동안 측정하고, μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타냈다. 혈액 손실은 생리 식염수, 증가하는 용량의 mFVIIa 또는 rhFVIIa의 정맥내 주사 후 측정했다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.
- [0081] 도 31은 평균 혈전 용해 시간을 정상으로 연장시키기 위한 rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa 단독 또는 조합의 최소 농도를 나타낸다. (a) 항-FVIII 항체(10 μ g/ml)로 스파이킹된 NHP에서 혈전 용해 시간의 항체 없는(+/- 10 %) NHP의 것으로의 연장. 정상 인간 혈장의 평균 혈전 용해 시간은 약 105분(n=3, SEM $\pm$ 6.4)이었고, rhFVIII를 갖는 FVIII 결핍 혈장의 평균 혈전 용해 시간은 각각 약 95분(n=3, SEM $\pm$ 7.5)이었다. 정상 인간 혈장; NHP.
- [0082] 도 32는 마우스 꼬리 클립 모델에서 ^{수퍼}FVa 및 NovoSeven® 단독 또는 조합에 의한 리바록사반 유도 출혈의 보정을 나타낸다. 야생형 마우스는 리바록사반 또는 생리 식염수를 정맥내 주사했다. ^{수퍼}FVa 또는/및 NovoSeven®은 리바록사반 주사 후 30분에 정맥내 주사했다. 꼬리 클립 후 출혈은 20분 동안 μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타낸다.
- [0083] 도 33a 및 b는 마우스 꼬리 클립 모델에서 ^{수퍼}FVa 또는 NovoSeven®에 의한 아픽사반 유도 출혈의 보정을 나타낸다. 야생형 Balb/c 마우스는 아픽사반 (패널 A에서 20mg/kg; 또는 패널 B에서 8mg/kg) 또는 생리 식염수를 정맥내 주사했다. ^{수퍼}FVa 또는 NovoSeven®을 리바록사반 주사 후 30분에 정맥내 주사했다. 꼬리 클립 후 출혈은 20분 동안 μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타낸다.
- [0084] 도 34a 및 b는 외상성 출혈이 ^{수퍼}FVa를 사용하여 생체내에서 치료될 수 있다는 것을 나타낸다. a) 혈우병 A 마우스는 APC 활성을 차단하는 APC에 대한 항체 SPC54(10mg/kg)로 처리했다(참조: Burnier L, Fernandez JA, Griffin JH. Antibody SPC-54 provides acute in vivo blockage of the murine protein C system. Blood Cells Mol Dis. 2013 Apr;50(4):252-8). 혈우병 A에서 APC 활성을 차단하면 출혈을 야생형 BalbC 마우스에서 관찰된 수준으로 감소시키는 반면, 열 불활성화된 SPC54 항체는 어떤 효과도 갖지 않았다. b) SPC54 항체에 의한 출혈 감소는 ^{수퍼}FVa 또는 FVIII에 의한 혈우병 A 마우스의 치료로 달성된 것과 동일했다. 이는 혈우병 출혈이 외상 및 쇼크가 출혈을 매개하는 내인성 APC의 활성화를 일으키는 급성 외상성 응고 장애의 다른 예임을 시사한다. 차단 항체 SPC54에 의해 또는 APC-내성 ^{수퍼}FVa에 의한 APC의 억제에 출혈을 감소시킨다.
- [0085] 상세한 설명
- [0086] 본 발명은 FVa, 바람직하게는 APC 분해에 내성인 FVa를 단독으로 또는 FVIIa와 함께 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 응고성 저하를 치료하거나 예방하고/하거나 출혈을 예방하고 치료하기 위한 신규 치료 레지멘을 제공하고, 바람직하게는 상기 FVIIa는 rhFVIIa(NovoSeven®)이다. 또한, 본 발명은 향상된 혈액 응고를 필요로 하는 대상체에게 투여가능한 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서 이러한 향상된 혈액 응고의 필요성은 임의의 출혈 장애 또는 상태, 예를 들면, 유전적 상태, 예를 들면, 혈우병, 후천적 출혈 장애, 월경 곤란증 또는 손상, 외상 또는 수술 결과로서의 이벤트, 또는 과도한 출혈을 일으킬 수 있는 침습 절차에 기인하여 발생할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 의해 치료 가능한 출혈 장애는 APC-관련되거나 APC-유도되거나 APC-매개된 출혈 장애, 예를 들면, 과도한 APC 생산(심각한 손상 또는 출혈성 쇼크로부터 생성되는 것과 같은) 또는 합성 또는 생물학적 응고제의 투여에 의해 발생하는 장애를 포함한다.
- [0087] 추가로, 본 발명은, 예를 들면, 과도한 APC 생산(심각한 손상 또는 출혈성 쇼크로부터 생성되는 것과 같은)에 기인하는 APC-관련되고, APC-유도되거나 APC-매개된 출혈을 예방하고, 치료하거나 역전시키기 위해 또는 APC 치료 동안, 예를 들면, 염증성 장애, 예를 들면, 혈소판 감소증, 파종성 혈관내 응고 또는 패혈증 질환의 치료 동

안 ^{수퍼}FVa를 단독으로 또는 FVIIIa와 함께 사용하는 방법을 제공한다.

[0088] 본 발명을 보다 잘 설명하기 위해, 다음 정의가 제공된다.

[0089] "대상체" 또는 "개체"는, 제한 없이, 인간 및 침팬지 및 다른 유인원 및 원숭이 종과 같은 비인간 영장류를 포함하는 다른 영장류; 소, 양, 돼지, 염소 및 말과 같은 가축; 개 및 고양이와 같은 가정용 포유동물; 마우스, 랫트 및 기니 피그와 같은 설치류를 포함하는 실험 동물; 가정용, 야생 및 게임 조류, 예를 들면, 닭, 칠면조 및 기타 가금 새, 오리 거위 등을 포함하는 조류를 포함하는 아문의 척색 동물의 임의의 구성원을 포함한다. 용어는 특정 연령을 의미하지 않는다. 따라서, 성인 및 신생아 개체 모두가 포함되는 것으로 의도된다. 본원에 기재된 발명은 상기 척추동물 중 중의 어느 하나에 사용하기 위한 것이다. 그러나, 특정의 바람직한 구현예에서, 대상체 또는 개체는 인간, 예를 들면, 유전적 또는 후천적 출혈 장애를 갖는 대상체 또는 손상, 외상, 월경 곤란증, 출혈을 일으키거나 목적하지 않은 출혈 위험을 증가시키는 수술 또는 다른 침습 절차, 또는 원인 불명의 출혈과 같은 상태를 갖는 사람이다.

[0090] ("외상의 결과로서의 출혈" 또는 "외상에 의한 출혈"과 상호교환적으로 사용되는) 용어 "외상성 출혈"은 손상으로 발생하는 출혈을 의미한다. 외상성 출혈을 일으키는 손상 (또는 외상)은 중증도가 다를 수 있다. 외상의 비제한적인 예는 찰과상, 혈종, 타박상, 열상, 절개, 찢린 상처, 파쇄 손상 및 총상을 포함한다. 외상성 출혈은 외부 및 내부 혈액 손실을 포함한다. 내부 출혈은 종종 중요한 물리적 손상 후 발생하지만, 이는 또한 덜 심각한 손상 후에 발생할 수 있거나 몇 시간 또는 며칠이 지연될 수 있다. 내부 출혈을 일으킬 수 있는 외상 또는 손상의 두 가지 주요 유형이 있다: 무딘 외상 및 관통 외상. 무딘 외상은 신체 부위가 일반적으로 고속으로 다른 어떤 것과 충돌할 때 발생한다. 무딘 외상의 결과로, 체내 혈관은 찢어지거나 전단력 및/또는 둔기에 의해 분쇄될 수 있다. 무딘 외상의 비제한적인 예는 차량 사고, 물리적 공격 및 추락을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 관통 외상은 이물질이 신체를 관통하여 하나 이상의 혈관에 구멍을 찢을 때 발생한다. 관통 외상의 비제한적인 예는 총상 또는 폭발 상처, 찢리기 또는 날카로운 물체 상의 낙하를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 거의 모든 기관 및 혈관은 외상에 의해 손상될 수 있고, 내부 출혈을 일으킬 수 있다. 외상으로 인한 내부 출혈의 가장 심각한 공급원은 내부 출혈을 동반한 머리 외상(두개내 출혈); 폐 주위의 출혈(혈흉); 심장 주위 출혈(심막혈종 및 심장 압전); 신체의 중심 주위의 큰 혈관(대동맥, 상하 대정맥 및 이들의 주요 분지)의 찢어짐; 및 간 또는 비장 열상 또는 다른 부드러운 기관의 천공과 같은 복부에의 외상으로 인한 손상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 출원의 목적을 위해, 외상성 출혈은 동물 모델, 즉, 외상성 꼬리 절단 또는 간 열상을 받은 야생형 마우스(참조: 도 11 및 13) 또는 외상성 꼬리 절단을 받은 혈우병 마우스(참조: 도 34)를 사용하여 생체내에서 연구되고, 외상으로 인한 급속한 출혈은 APC-유도 외상성 응고장애에 의해 부분적으로 또는 전체적으로 매개된다. 외상성 출혈 환자는, 본원에 개시된 바와 같이, 이들의 혈액 응고를 적절히 돕기 위해 치료를 받을 수 있다.

[0091] 용어 "환자"는 본 발명의 치료 레지멘으로 예방되거나 치료될 수 있는 상태로 고통받거나 발생하기 쉬운 생체를 의미하고, 인간 및 동물을 모두 포함한다.

[0092] 용어 "aPCC 농축물"은 인자, 예를 들면, FVII, 프로트롬빈(FII), FIX 및/또는 FX (및 이들의 활성 형태)를 함유하는, FEIBA와 같은 활성화 프로트롬빈 복합체 농축물(activated Prothrombin Complex Concentrates)을 의미한다.

[0093] 용어 "인자 Va" 및 "FVa"는 "인자 V" (또는 "FV")의 활성화 형태, 바람직하게는 인간 FVa를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, FVa 및 FV는 wt FV 서열(NM_000130.4; NP_00121.2) 뿐만 아니라 FV의 모든 공지된 다형성(참조: 인자 V의 공지된 다형성을 요약하는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=2153)을 포함한다. 예를 들면, FV는 위치(들) Asp2222, Glu2217, Ala2213, Ile2204, Arg2202, Phe2200, Ile2197, Lys2185, Glu2179, Asp2175, Glu2163, Val2162, Thr2154, Lys2151, Met2148, Thr2134, Thr2134, Leu2128, Arg2108, Leu2103, Leu2103, Phe2087, Ser2086, Ser2085, Gln2081, Met2072, Pro2069, Cys2066, Arg2055, Glu2029, Thr2026, Asn2010, Gln2001, His1983, Gln1975, Ile1972, Ala1955, Ser1949, Ser1944, Gly1930, Lys1924, Pro1910, Arg1908, Thr1898, Thr1898, Ala1894, Met1874, Pro1863, Gly1853, His1845, Val1841, Gly1835, Gly1834, Ile1833, Leu1830, Met1820, Leu1818, Pro1816, Tyr1813, Met1811, His1806, Thr1795, Trp1792, Ser1790, Arg1789, Tyr1783, Phe1776, Val1770, Met1764, Met1762, Ile1755, Lys1753, Leu1749, Ile1745, Leu1744, Arg1726, Gly1722, Gly1717, Ser1716, Tyr1708, Glu1687, Thr1685, Ser1680, Gly1674, His1673, Pro1667, Ser1665, Ala1664, Arg1659, Leu1641, Leu1624, Val1618, Tyr1615, Tyr1615, Asp1612, Asp1605, Gln1598, Asn1575, Asn1559, Arh1555, Val1554, Asp1547, Tyr1546, Val1544, Glu1530, Ile1523,

Asp1521, Asp1518, Ser1516, Leu1503, Asn1499, Gln1476, Ser1469, Pro146, Ser1455, Ile1454, Leu1451, Pro1449, Thr1445, Thr1437, Val1436, Gln1435, Ser1430, Asn1423, Met1409, Asp1407, Pro1404, Ley1397, Ser1376, Asn1374, Asp1369, Thr1365, Pro1361, Asp1360, Met1355, Gly1353, Leu1352, Asn1338, Phe1334, Leu1330, His1327, Pro1323, Ile1321, Gln1318, Gly1317, Leu1316, Leu1303, Phe1289, Leu1285, Thr1284, His1282, Pro1278, Leu1276, Leu1271, Ser1268, Leu1267, Ser1259, Leu1253, Leu1249, Thr1247, His1246, Pro1242, Ser1236, Asp1234, Pro1230, Gly1227, Ser1223, Gln1219, Thr1211, His1210, Leu1208, Pro1206, Ser1200, Thr1194, Pro1188, Val1185, trp1182, His1179, Ser1174, Thr1168, Ser1162, Arg1161, Asp1160, Tyr1159, Met1156, Glu1152, Ser1149, Ser1148, His1114, Pro1135, Asp1134, Pro1131, Pro1122, Gln1110, Gly1109, Ser1104, Leu1086, Thr1085, Asp1081, Thr1080, Asn1074, His1071, Ser1067, Lys1065, Glu1054, Leu1051, Gln1024, Gly1016, Asp1014, Gln1013, Lys1000, Ala981, Arg980, Pro975, Asn969, Ala967, Thr966, Asp961, Ile959, Tyr956, Ser955, Ser951, Leu949, Gly945, Gln936, Lys925, Pro918, Thr915, Ser912, trp907, Arg905, Met904, Ser902, Pro901, Ser900, Val890, Lys877, Lys869, Gly867, His865, Lys858, Phe857, Gly853, Arg848, Asn821, Asn817, Gly815, Pro809, Gln802, Pro798, Ala797, Gln795, Asn789, Ser781, Pro780, Ser779, Gly774, Ile772, Ser767, Phe764, Glu763, Gly761, Leu753, Asn745, Ser742, Asn741, Arg740, Ile736, Ala732, Ser720, Glu719, Glu714, Arg712, His710, Arg707, Thr702, Phe696, Glu690, Pro686, Phe679, Lys678, Lys674, Ser672, Pro670, Ser669, Met666, Thr664, Asp656, Thr652, Arg647, Thr642m Ley641, Thr640, Lys635, Gly628, Ile624, Thr623, Gln618, Val608, Glu595, Tyr592, Gly591, Glu572, Asn554, Glu553, Gln545, Leu522, Arg513, Lys484, Tyr481, Thr464, Ser461, Asn460, Glu458, Tyr455, Pro447, Val434, Ile433, Arg428, Lys414, Met413, Asn410, Val394, Lys392, Gln386, Asn385, Arg376, Asp372, Met371, Ala369, Asp362, Ile354, Phe353, Arg345, Arg341m Asn335, Lys332, Cys329, Ile324, Gln321, Pro313, Lys305, Asn297, Thr295, Ser293, Lue288, Thr287, Glu277, Leu276, Val275, Gln274, Asn272m Phe267, Ser262, Leu257, His250, Thr246, Pro243, Gln210, Thr206, Pro189, Gly188, Ser184, Glu180, Ile179, His175, His170, Pro166, Glu151, Arg146, Val142, Ala141, Met138, Ala135, Phe133, Ser123, Gln115, Leu110, Pro109, Asp107, Ile97, Asp96, Gly95, Val94, Tyr91, Leu85, Ile82, Gln79, Tyr69, Arg46, Ala38, Ala37, Val36, Ala28, Gly15, Gly4 (NP_000121.2의 wt 서열에 대해)의 아미노산을 변경하는 하나 이상의 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)을 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, FVa는 APC 내성이도록 하는 돌연변이, 예를 들면, ^{수퍼}FVa 또는 본원에 개시된 다른 변이체를 포함할 것이다. 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에서, FVa는 화학적 변형(예를 들면, 을 포함할 수 있다 단백질의 다른 성질의 물리적 안정성을 향상시키는 PEG화). 본 출원의 목적을 위해, "인자 V" 및 "인자 Va"는 인자의 야생형, 혈장 유도된, 라이덴 및 캄브리지 FV 및 FVa 형태를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0094] 본원에서 용어 "^{수퍼}FVa"는 향상된 특성, 예를 들면, 향상된 보조 인자 안정성, 향상된 특정 활성 및/또는 향상된 혈액 중 반감기를 갖도록 변형된 FVa 분자 또는 단편 또는 이의 변이체를 의미한다. FVa 보조 인자 안정성을 향상시키는 변형의 비제한적인 예는 FVIIIa에 대해 최근에 입증된 바와 같이, 분자를 안정화시키기 위해 이황화 쌍을 형성하는 시스테인 잔기의 도입, 유인성 정전기적 상호작용을 도입하고, 대향하는 정전기적 상호작용을 제거하고/하거나 소수성 상호작용을 도입하는 A1, A2, B, A3, C1, 및/또는 C2 도메인의 계면에서의 돌연변이를 포함하나, 이에 한정되지 않는다(참조: *Noncovalent stabilization of the factor VIII A2 domain enhances efficacy in hemophilia A mouse vascular injury models*, Lilley Leong, Derek Sim, Chandra Patel, Katherine Tran, Perry Liu, Elena Ho, Thomas Thompson, Peter J. Kretschmer, Hironao Wakabayashi, Philip J. Fay, and John E. Murphy. Blood 2014 (in press) (DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-02-555656>). FVa의 특정 활성을 향상시키는 변형의 예는 FXa에 대한 FVa의 친화성을 증가시키는 이황화 쌍 또는 돌연변이 및 변화를 형성하는 시스테인 잔기의 도입, 예를 들면, A2-A3 계면의 돌연변이, a1 도메인을 포함하는 FX에 고친화성 결합을 제공하는 것으로 공지된 FVIII의 서열의 도입을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 순환에서 FVa 반감기를 향상시키는 변형의 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체 또는 다량체, Fc 수용체 융합 도메인, 알부민 융합, 또는 순환에서 반감기를 연장시키거나 클리어런스 메커니즘을 감소시킬 수 있는 다른 공지된 구조와 같은 합성 또는 화학적 변형의 부위 지시된 포함의 도입을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0095] 특정 구현예에서, ^{수퍼}FVa는 단백질에 APC 불활성화에 내성이도록 하는, 바람직하게는 매우 APC 내성인 돌연변이, 예를 들면, 본원에 개시된 특정 돌연변이의 조합을 포함한다. 바람직하게는, ^{수퍼}FVa는 이하 아미노산 서열(서열 번호 1)을 포함한다. 이 서열은 (프리프로 서열이 없는) 성숙한 FVa 단백질을 포함한다. 명확하게 하기 위해, 이 단백질은 야생형 인간 FV에 대해 다음과 같이 변경된다: 812-1491의 서열이 결실된다(B 도메인으로부터).

원래 전장 FV 서열 넘버링에 기초하는 이 결실 이외의 모든 변화의 경우, ^{수퍼}FVa는 바람직하게는 다음 돌연변이를 포함한다: R306Q, R506Q, R679Q, H609C, E1691C (1011), S21831A (1503).

1 aqlrqfyvaa qgiswsyrpe ptnsslnlsv tsfkkivyre yepyfkkekp qstisgllgp
61 tlyaevgdii kvhfkknadk plsihpqgir ysklsegasy ldhtfpaekm ddavapgrey
121 tyewsiseds gpthddppcl thiyyshenl iedfnsglig pllickkgtl teggtqktfd
181 kqivllfavf deskswsqss slmytvngyv ngtmpditvc ahdhiswhll gmssgpelfs
241 ihfngqvleq nhhkvsaitl vsatsttanm tvgpegkwii ssltpkhlqa gmqayidikn
301 cpkktqnlkk iteqrrhmk rweyfiaaee viwdyapvip anmdkkyrsq hldnfsnqig
361 khykkvmytq yedesftkht vnpmkedgi lgpiiraqvr dtlkivfknm asrpysiyph
421 gvtfspyede vnssftgrn ntmiravqpg etytkwnil efdeptenda qcltrpyysd
481 vdimrdiasg liglllicks rsldrqqiqr aadieqqavf avfdenkswy ledninkfce
541 npdevkrddp kfyenimst ingyvpesit tlghcfddtv qwhfcsvgtq neiltihftg
601 hsfyigkrce dtltlfpmrq esvtvtmdnv gtwmltsmns sprskklrlk frdvkcipdd
661 dedsyiefep pestvmatqk mhdrlepede esdadydyqn rlaalgirs frnsslnqee
721 eefnltalal engtefvssn tdiivgsnys spsniskftv nnlaepqkap shqqattags
781 plrhligkns vlnsstaehs spysedpied ptdyieiipk eevqsseddy aeidyvpydd
841 pyktdvrti nssrdpdia awylrsnngn rnyyiaaee iswdysefvq retediedsdd
901 ipedttykkv vfrkyldstf tkrdprgeye ehlgilgpil raevddviqv rfknlasrpy
961 slhahglsye kssegktyed dspewfkedn avqpnssyty vwhatersgp cspgsacraw
1021 ayysavnpek dihsngligpl licqkgilhk dsnmpvdmre fvllfntfde kkswyekks
1081 rsswrltsse mkkshefhai ngmiyslpgl kmyeqewvrl hllniggsqd ihvvfhgqt
1141 llengnkqhq lgvwpllpqs fktlemkask pgwwllntev genqramqt pflimdrdr
1201 mpmglstgii sdsqikasef lgyweprlar lnnggsynaw sveklaaefa skpwivqdmq
1261 keviitgiqt qgakhyksc yttefyvays snqinwqifk gnstrnvmyf ngnsdastik
1321 enqfdppiva ryirispra ynrtlrlel qgeevngest plgmengkie nkqitassfk
1381 kswwgdywep frarlmaqgr vnawqakann nkqwleidll kikkitaait qgckslssem
1441 yvksytihys eqgvewkpyr lkssmvdki egntntkghv knffnppiis rfirvipktw

[0099]

[0100]

KSRSSWRLTSSEMKKSHEFHAINGMIYSLPGLKMYEQEWVRLHLLNIG
 GSQDIHVVFHFGQTLENGNKQHQLGVWPLLPGSFKTLEMKASKPG
 WLLNTEVGENQRAGMQTPFLIMDRDCRMPMGLSTGIISDSQIKASEF
 LGYWEPLARLNNGGSYNAWSVEKLAAEFASKPWIQVDMQKEVIITG
 IQTQGAHYLKSCYTTEFYVAYSSNQINWQIFKGNSTRNVMYFNGNS
 DASTIKENQFDPPIVARYIRISPTRAYNRPTLRLELQGCEVNGCSTPLG
 MENGKIENKQITASSFKKSWWDYWEPPFRARLNAQGRVNAWQAKA
 NNNKQWLEIDLLKIKKITAHTQGCKSLSEMYVKSYTIHYSEQGVEWK
 PYRLKSSMVDKIFEGNTNTKGHVKNFFNPPIISRFIRVIPKTWNQAIALR

[0101]

LELFGCDIY* (서열번호 4)

[0102]

[0103]

용어 "인자 VIIa" 또는 "FVIIa"는 인자 VII의 활성화 형태를 의미한다. 이는 특히 노보 노르디스크(Novo Nordisk)로부터 시판되는 NovoSeven®로서 칭명되는 FVIIa 제품을 포함한다. 또한, FVIIa는, 예를 들면, 돌연 변이(들) 때문 및/또는 이에 반감기 향상 본체, 예를 들면, PEG 또는 아실 그룹의 첨가 또는 부착 결과로서 야 생형에 비해 긴 반감기 또는 증가된 활성을 갖는 제조합 FVIIa의 다른 변이체를 포함한다. 따라서, 본원에 사 용된 바와 같이, FVIIa는 야생형 FVIIa의 서열 및 향상된 활성 또는 안정성을 갖는 이 서열의 변이체, 예를 들 면, N-, C- 및/또는 내부 결실, 부위 돌연변이를 포함하고/하거나 하나 이상의 안정화 또는 다른 관능기를 포함 하는 절단된 형태를 포함한다. 인간 FVIIa 폴리펩타이드의 서열은 이하 제시된다:

ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ
 CASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG
 CEQYCSHTGTGRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRN
 ASKPQGRIVGGKVCCKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAA
 HCFDKIKNWRNLIQVAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
 HDIALLRHLHQPVVLTQHVVPCLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLL
 DRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCAGYS
 D
 GSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFVYTRV

[0104]

SQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (서열번호 2)

[0105]

[0106]

인간 프로-FVII 폴리펩타이드의 서열(NP_000122.1에 상응; 응고 인자 VII 동형 프레프로단백질, 호모 사피엔 스)은 이하 제시된다:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAGGVAKASGGETRDMPWKPGPHRVFV
 TQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAE
 RTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCET
 HKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTGRSCRCHEGYSLADGVSTPT
 VEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCCKGECPWQVLLLVNGAQLC
 GGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIQVAVLGEHDLSEHDGDEQSRRV
 AQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRHLHQPVVLTQHVVPCLCLPERTFSERTLAF
 VRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS
 P
 NITEYMFCAGYSDDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQ

[0107]

[0108]

CATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (서열번호 3)

[0109]

[0110]

용어 "인자 IXa" 또는 "FIXa"는 "인자 IX"의 활성화 형태를 의미한다. 이는 활성화를 위한 FVIII 또는 FVIIIa에 대한 감소된 관능적 의존성을 갖는 FIXa 및 FIX의 돌연변이 및 변이체를 포함한다. 예를 들면, Y259F, K265T, Y345T, V181I, R338A 및/또는 I383V에 돌연변이를 갖는 FIX. [참조: Chang 등, J Biol Chem, 273: 12089-94 (1998); Milanov 등, Blood 119(2):602-611 (2012); Quade-Lyssy 등, J Genet Syndr Gene Ther S1:013 (2012), 이의 개시 내용은 본원에 명백하게 참조로 인용된다.] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, FIXa는 야생형 FIXa의 서열 및 향상된 활성 또는 안정성을 갖는 이 서열의 돌연변이 및 변이체, 예를 들면, N-, C- 및/또는 내부 결실, 부위 돌연변이를 포함하고/하거나 하나 이상의 안정성 또는 다른 관능기, 예를 들면, 글리코변이체를 포함하는 절단된 형태를 포함한다(참조: Brooks 등, J. Thrombosis and Haemostasis, 11(9): 1699-1706 (2013)).

[0111]

용어 "인자 Xa" 또는 "FXa"는 "인자 X"의 활성화 형태를 의미한다. 이는 FXa 및 FX의 돌연변이 및 변이체를 포함한다. 예를 들면, (키모트립신 넘버링에 따라) 위치 16, 17 및/또는 18에 돌연변이를 갖는 FX 및 FXa. 야생형 FXa보다 긴 반감기를 갖고 응고의 과도한 활성화를 일으키지 않는 FXa^{I16L}가 FXa에 또한 포함된다. [참조: 예를 들면, Ivanciu 등, Nature Biotech 29: 1028-1033 (2011), 이의 개시 내용은 명백하게 본원에 참조로 인용된다.] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, FXa는 야생형 FXa 및 향상된 활성 또는 안정성 또는 특이성을 갖는 이 서열의 돌연변이 및 변이체, 예를 들면, N-, C- 및/또는 내부 결실, 부위 돌연변이를 포함하고/하거나 하나 이상의 안정성 또는 다른 관능기를 포함하는 절단된 형태를 포함한다.

[0112]

용어 FVa 및 FVIIa, 바람직하게는 ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa(NovoSeven®)에 의한 "치료의 치료적으로 유효한 사이클"은, 투여될 경우, 예를 들면, 수술, 손상의 결과로서 또는 치료 동안 APC의 과발현 또는 APC의 투여에 의해 일어나는 출혈 장애를 갖거나 출혈 장애 또는 출혈 상태를 발병시킬 위험에 있는 개체의 치료와 관련하여 양성 치료 반응을 일으키는 치료 사이클로서 의도된다. 바람직하게, 치료는 트롬빈 생성에 영향을 미치거나 APC 또는 다른 항응고제의 항응고 효과를 역전시킴으로써 응혈 또는 응고 또는 APC-관련 출혈에 대한 상승 효과를 도출한다.

[0113]

"양성 치료 반응"은 본 발명에 따르는 치료를 받은 개체가 짧은 혈액 응고 시간 및 감소된 출혈 및/또는 인자 대체 요법에 대한 감소된 필요성으로서 이러한 개선을 포함하는 출혈 장애의 하나 이상의 증상의 개선을 나타내는 것이다. 바람직하게는, 투여는, 예를 들면, 이하 논의되고 작업 실시예에 나타난 바와 같이 APC 투여 결과로서 트롬빈 생성을 촉진하거나 트롬빈 생성의 절제를 예방함으로써 응혈 또는 응고에 대한 효과, 바람직하게는 상승 효과를 도출할 것이다.

[0114]

"응고촉진제"는 혈전 형성을 개시하거나 촉진할 수 있는 임의의 인자 또는 시약을 의미한다. 응고촉진제는 내인성 또는 외인성 응고 경로의 임의의 활성화제, 예를 들면, FXa, FIXa, FXIa, FXIIa, 칼리크레인, 조직 인자, FVIIa, 및 트롬빈으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 응혈 인자 뿐만 아니라 FVIIIa, FXIIIa, 및 트롬빈 활성화 가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI), 활성화된 TAFI(TAFIa); 및 VII, FII, FIX 및 FX (및 이들의 활성 형태)를 포함할 수 있는 활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물(aPCC), 예를 들면, FEIBA를 포함한다. 응혈을 촉진시키는 다른 시약은 프리칼리크레인, 폴리포스페이트, APTT 개시제(즉, 인지질 및 접촉활성화제를 함유하는 시약), 릿셀 사독(RVV 시간), 항-섬유소 용해제, 예를 들면, 트라넥삼산 또는 엽실론-아미노카프로산, 및 트롬보플라틴(PT 및 dPT를 위한)을 포함한다. 응고촉진 시약으로서 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 접촉 활성화제는 미분된 실리카 입자, 엘라그산, 셀파티드, 카올린 또는 당업자에게 공지된 유사물을 포함한다. 응고촉진제는 단리되고 실질적으로 정제된 합성 또는 재조합성 원유 천연 추출물, 혈액 또는 혈장 샘플 유래될 수 있다. 응고촉진제는 생물학적 활성을 유지하는(즉, 응혈을 촉진시키는) 천연 발생 응혈 인자 또는 단편, 변이체, 유사체 또는 유테인을 포함할 수 있다.

[0115]

용어 "변이체", "유사체" 및 "유테인"은 본원에 기재된 출혈 장애의 치료에 있어서 목적하는 활성, 예를 들면, 응고 활성을 유지하는 참조 분자의 생물학적 활성 유도체를 의미한다. 본 발명에서, FVa의 변이체는 생성되는 변이체 또는 유테인의 APC 분해를 억제하는 하나 이상의 천연 발생 또는 유전적으로 조작된 돌연변이를 함유한다. 일반적으로, 폴리펩타이드(예를 들면, 에 관한 용어 "변이체" 및 "유사체" 변형이 생물학적 활성을 파괴하지 않는 한, 천연 분자와 비교하여 하나 이상의 아미노산 첨가, 치환(일반적으로 특성상 보존적) 및/또는 결실에 의해 천연 폴리펩타이드 서열 및 구조와 상이하고 이하 정의되는 참조 분자와 "실질적으로 상동성"인 FVa 또는 FVIIa 폴리펩타이드). 일반적으로, 이러한 변이체 또는 유사체의 아미노산 서열은 참조 서열과 고도의 서열

상동성, 예를 들면, 두 서열이 정렬될 때, 50% 이상, 일반적으로 60%-70%, 더욱 더 특히 80%-85% 이상, 예를 들면, 적어도 90%-95% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가질 것이다. 종종, 유사체는 동일한 수의 아미노산을 포함하지만, 본원에 설명된 바와 같이, 치환을 포함할 것이다. 추가로, 예를 들면, FVa, FVIIa, FIX 및 FX의 변이체는 동일한 아미노산 서열을 함유하지만 화학적 변형, 예를 들면, 공유 변형, 이의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않고 변이체의 물리적 특성(예를 들면, 혈중 연장된 반감기)을 향상시키는 PEG화(폴리-에틸렌 글리콜(PEG)의 부착), HES화(하이드록시에틸 전분(HES)의 부착), XTEN화(XTEN(폴리펩타이드)의 부착), HAS화(인간 혈청 알부민(HSA)의 부착), PAS화(작은 잔기 Pro, Ala 및 Ser(PAS)을 포함하는 확장된 유체역학적 용적을 갖는 폴리펩타이드 쇄의 부착), 글루타밀화(폴리글루탐산의 부착) 등을 포함하는 생물학적 활성 유도체를 포함한다.

[0116] 용어 "뮤테인"은 추가로 한정되지 않지만 단지 아미노 및/또는 이미노 분자를 포함하는 화합물을 포함하는 하나 이상의 아미노산형 분자를 갖는 폴리펩타이드, 아미노산의 하나 이상의 유사체를 함유하는 폴리펩타이드(예를 들면, 비천연 아미노산 등을 포함), 치환된 결합을 갖는 폴리펩타이드 뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 변형, 천연 발생 및 비천연 발생(예를 들면, 합성), 사이클릭화되고 분지된 분자 등을 포함한다. 상기 용어는 또한 하나 이상의 N-치환된 글리신 잔기("펩타이드") 및 다른 합성 아미노산 또는 펩타이드를 포함하는 분자를 포함한다. (참조: 예를 들면, 미국 특허 번호 5,831,005; 5,877,278; 및 5,977,301; Nguyen 등, Chem. Biol. (2000) 7:463-473; 및 Simon 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367-9371, 펩타이드의 설명용). 바람직하게는, 유사체 또는 뮤테인은 다른 것에 대한 하나의 활성, 예를 들면, 천연 분자에 대한 응고 활성에 대해 적어도 동일하거나 증가되거나 감소된 활성 또는 선택도를 갖는다. 폴리펩타이드 유사체 및 뮤테인의 제조방법은 당해 분야에 공지되어 있고 이하 추가로 기재된다.

[0117] 상기 설명된 바와 같이, 유사체는 또한 특성상 보존적인 치환, 즉, 이들의 측쇄에 관련되는 아미노산의 패밀리 내에서 발생하는 치환을 포함한다. 구체적으로, 아미노산은 일반적으로 4개 패밀리로 나누어진다: (1) 산성-아스파테이트 및 글루타메이트; (2) 염기성-리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성-알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비하전된 극성-글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 때로 방향족 아미노산으로 분류된다. 예를 들면, 이소류신 또는 발린에 의한 류신, 글루타메이트에 의한 아스파테이트, 세린에 의한 트레오닌의 단리된 교체, 또는 구조적으로 관련된 아미노산에 의한 아미노산의 유사한 보존적 교체는 생물학적 활성에 대한 주요 효과를 갖지 않는다는 것을 합리적으로 예측할 수 있다. 예를 들면, 목적하는 폴리펩타이드는 최대 약 5-10개 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 또는 심지어 최대 약 15-25개 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 또는 분자의 목적하는 기능이 온전하게 잔류하는 한, 5 내지 25 사이의 임의의 정수를 포함할 수 있다. 당업자는 당해 기술 분야에 익히 공지된 호프/우즈(Hopp/Woods) 및 카이트-둘리틀(Kyte-Doolittle) 플롯을 참조하여 변화를 견딜 수 있는 목적하는 분자의 영역을 쉽게 측정할 수 있다.

[0118] "단편"은 온전한 전장 서열 및 구조의 일부만으로 이루어진 분자가 의도된다. 폴리펩타이드의 단편은 천연 폴리펩타이드의 C-말단 결실, N-말단 결실 및/또는 내부 결실을 포함할 수 있다. 특정 단백질의 활성 단편은 일반적으로 전장 분자의 적어도 약 5-10개의 연속 아미노산 잔기, 바람직하게는 전장 분자의 적어도 약 15-25개의 연속 아미노산 잔기, 가장 바람직하게는 전장 분자의 적어도 약 20-50개 이상의 연속 아미노산 잔기, 또는 문제의 단편이 본원에 정의된 바와 같이 응고 활성과 같은 생물학적 활성을 유지하는 한, 5개의 아미노산과 전장 서열 사이의 임의의 정수를 포함할 것이다.

[0119] "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오타이드 또는 두 개의 폴리펩타이드 잔기 사이의 동일성 퍼센트를 의미한다. 두 개의 핵산 또는 두 개의 폴리펩타이드 서열은, 서열이 분자의 정의된 길이에 대해 적어도 약 50%, 바람직하게는 적어도 약 75%, 보다 바람직하게는 적어도 약 80%-85%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 가장 바람직하게는 적어도 약 95%-98% 서열 동일성을 나타낼 때 서로 "실질적으로 상동성"이다. 본원에 사용된 바와 같이, 실질적으로 상동성은 또한 특정 서열에 대한 완전한 동일성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0120] 일반적으로, "동일성"은 각각 두 개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 정확한 뉴클레오타이드-대-뉴클레오타이드 또는 아미노산-대-아미노산 상응을 의미한다. 동일성 퍼센트는 서열을 정렬시키고, 두 개의 정렬된 서열 사이의 정확한 수의 일치율을 계수하고, 참조 서열의 길이로 나누고 결과에 100을 곱하여 두 분자(참조 서열과 참조 서열에 대해 공지되지 않은 % 동일성을 갖는 서열) 사이의 서열 정보를 직접 비교하여 측정할 수 있다. 쉽게 사용할 수 있는 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, ALIGN, Dayhoff, M. 은 분석을 돕기 위해 사용될 수 있고, O. in Atlas of Protein Sequence and Structure M. O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 이는 문헌[참조: Appl. 의 스미스 및 워터먼의 국소 상동성 알고리즘을 채택한다 Math. 펩티드 분석을 위한 2:482-489, 1981]. 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기

위한 프로그램은 위스콘신 서열 분석 패키지, 버전 8(제네틱스 컴퓨터 그룹, 매디슨, 위스콘신으로부터 사용 가능), 예를 들면, 또한 스미스 및 워터맨 알고리즘에 의존하고 있는 BESTFIT, FASTA 및 GAP 프로그램에 사용할 수 있다. 이러한 프로그램은 제조업자에 의해 권장되고 상기 언급된 위스콘신 서열 분석 패키지에 기재된 디폴트 파라미터와 함께 쉽게 사용된다. 예를 들면, 참조 서열에 대한 특정 뉴클레오타이드 서열의 동일성 퍼센트는 디폴트 점수 표 및 6개의 뉴클레오타이드 위치의 갭 페널티와 함께 스미스 및 워터맨의 상동성 알고리즘을 사용하여 측정할 수 있다.

[0121] 본 발명의 맥락에서 동일성 퍼센트를 확립하는 다른 방법은 존 에프.(John F.)에 의해 개발되고, 에딘버러 대학에 의해 저작권이 보호된 프로그램의 MPSRCH 패키지를 사용하는 것이다 콜린스 및 셰인 에스.(Collins and Shane S.) 스투록(Sturrok), 인텔리제네틱스, 인코로포레이티드(IntelliGenetics, Inc.)에 의해 분포된 (마운틴 뷰, 캘리포니아). 패키지의 이 스위트로부터, 디폴트 파라미터가 점수 표(예를 들면, 갭 오픈 페널티 12, 갭 연장 페널티, 및 갭 6)를 위해 사용되는 스미스-워터맨 알고리즘을 사용할 수 있다. 생성된 데이터로부터, "일치" 값은 "서열 동일성"을 반영한다. 서열 사이의 퍼센트 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 다른 적합한 프로그램은 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 다른 정렬 프로그램은 디폴트 파라미터와 함께 사용되는 BLAST이다. 예를 들면, BLASTN 및 BLASTP가 다음 디폴트 파라미터를 사용하여 사용될 수 있다: 유전 코드=표준; 필터=없음; 가닥=모두; 컷오프=60; 예상치=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50 서열; 정렬=높은 점수; 데이터베이스=비다중성, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 번역+스위스 단백질+Spupdate+PIR. 이 프로그램의 상세함은 쉽게 사용할 수 있다.

[0122] 핵산 분자를 기재하기 위해 본원에 사용된 "재조합"은 이의 기원 또는 조작에 의해 그것이 특성상 관련되는 폴리뉴클레오타이드의 모두 또는 일부와 관련되지 않는 게놈, cDNA, 바이러스, 반합성 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 단백질 또는 폴리펩타이드와 관련하여 사용된 용어 "재조합"은 재조합 폴리뉴클레오타이드의 발현으로 생성된 폴리펩타이드를 의미한다.

[0123] 본 발명에서 출혈을 치료하거나 예방하기 위해 사용된 방법 및 조성물은 단독 또는 FVIIa와 조합된 FVa 이외에, 하나 이상의 다른 인자 또는 응고 인자, 예를 들면, FXI, FXII, 프레칼리크레인, 고분자량 키니노젠(HMWK), FVIII, FVIIIa, FIX, FX, FXIII, FII, FVIIa, 및 폰 빌레브란트 인자, 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI) 항-섬유소 용해제(예를 들면, 를 추가로 포함할 수 있다 때로 출혈을 예방하기 위해 혈우병 및 기타 출혈 장애에 사용되는 아미카, 트라넥삼산, ε 아미노카프로산, 아프로티닌 등)(예를 들면, 발치 동안 사용되는 것).

[0124] 아래에 개시된 혈전 용해 용해 데이터는 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa 사이의 상승작용이 트롬빈 생성의 결합에 기인하여 혈우병에서 손실된 섬유소 용해에 대한 응고의 내성을 복원한다는 것을 입증한다. FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용은 신체의 자연적인 항섬유소 용해제 중의 하나인 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)("TAFI")의 활성화를 복원한다. 따라서, (1) 응고의 내성을 복원하거나 혈전 용해 시간을 증가시키는 것은 트롬빈 생성 이외에, FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용의 기능적 효과의 다른 척도이고, (2) 응고의 내성을 복원하거나 혈전 용해 시간을 증가시키는 것은 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용이 출혈을 감소시키는 이유의 기전의 중요한 부분이고, (3) 후자에 기인하여, FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용에 의한 출혈의 감소에 대한 효과를 증폭시키기 위해 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용을 항-섬유소 용해제 또는 TAFI와 결합하는 것이 유리할 수 있다.

[0125] 응고 인자, 예를 들면, FVa, 바람직하게는 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa, 바람직하게는 rhFVIIa(NovoSeven®)의 용량은 조합하여 출혈을 치료하거나 예방하고 응고를 향상시키기에 효과적인 양이다. 바람직하게는, 이러한 두 개의 폴리펩타이드의 상대적 투여량은 트롬빈의 생성을 촉진함으로써 응혈 또는 응고에 대한 상승 효과를 유발할 것이다.

[0126] 본원에서 "상승적으로 유효한 양"은 FVa, 바람직하게는 APC 분해에 대해 매우 내성인 ^{수퍼}FVa의 상대적 양 및 FVIIa, 바람직하게는 조합하여, 즉 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진함으로써 이들 잔기 중의 어느 하나 단독의 첨가 효과보다 큰 유리한 또는 상승 효과를 유도하는 rhFVIIa(NovoSeven®)의 양을 의미한다. 본 발명에서, 상승작용은 정상화된 혈전 용해 시간을 고려하여 이들 잔기 단독으로 생성된 증가에 비해 ETP의 증가, 예를 들면, ETP의 적어도 0.5배 증가, 더욱 바람직하게는 적어도 1배 증가, 더욱 더 바람직하게는 추가의 약 1.5 내지 2-2.5 또는 3.0배 증가, 및 피크 높이의 약 2 내지 3배 증가에 기초하는 FVIII 억제 항체를 함유하거나 부족한 정상 인간 혈장에서 입증된다. 또한, 본원에서 "상승적으로 유효한 양"은 FVa, 바람직하게는 APC 분해에 매우 내

성인 ^{수퍼}FVa의 상대적 양 및 임의로, 신체의 자연적 항섬유소 용해제 중의 하나인 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI)의 활성화를 향상시키거나 복원하기에 충분한 FVIIa의 양을 의미한다. 따라서, 본원에서 상승작용은 또한 상승적으로 트롬빈 생성을 유도하고, 응고의 내성을 복원하거나 혈전 용해 시간을 증가시키거나 포함하거나 또는 대안적으로 의미할 수 있다. (이는 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용이 혈우병에서 출혈을 감소시키는 이유 및 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용에 의한 출혈의 감소에 대한 효과를 증폭시키기 위해 FVIIa/^{수퍼}FVa를 항-섬유소 용해제 또는 TAFI와 결합하는 것이 추가로 유리할 수 있는 이유의 메커니즘의 중요한 부분이다). FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용은 신체의 자연적 항섬유소 용해제 중의 하나인 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI)의 활성화를 복원한다. 따라서, 응고의 내성을 복원하거나 혈전 용해 시간을 증가시키는 것은, 트롬빈 생성 이외에, FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용의 기능적 효과의 척도이다.

[0127] 아래에 제시된 실험 결과에 기초하여, 응고의 내성을 복원하거나 혈전 용해 시간을 증가시키는 것은 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용이 혈우병에서 출혈을 감소시키는 이유 및 이에 기초하여 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용을 항섬유소 용해제 또는 TAFI와 결합시키는 것이 FVIIa/^{수퍼}FVa 상승작용에 의한 출혈의 감소에 대한 상승 효과를 추가로 증폭시킬 수 있는 이유인 것으로 간주된다.

[0128] 이러한 이해와 함께, 본 출원은 일반적으로 바람직하게는 상승적으로 유효한 양의 FVa, 바람직하게는 APC 내성 FVa, 즉, 바람직하게는 본원에 기재된 ^{수퍼}FVa와 같은 APC 내성 FVa, 및 FVIIa, 바람직하게는 rhFVIIa, 예를 들면, (NovoSeven®), 또는 재조합 FVIIa의 다른 변이체, 바람직하게는 향상된 반감기 또는 증가된 활성을 나타내는 것; 또는 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제의 투여를 포함하는 치료 레지멘에 의해 이를 필요로 하는 개체에서 출혈 및/또는 응고성 저하를 예방하거나 치료하기 위한 방법 및 이러한 방법에 사용하기 위한 조성물에 관한 것이고, 여기서 조합은 이를 필요로 하는 대상체에게 단독으로 투여될 때 FVa 또는 FVIIa 또는 다른 응고촉진제 또는 프로-지혈제와 비교하여 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 유도한다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "응고성 저하"는 하나 이상의 응고 인자에서 유전적 또는 후천적 결핍 및/또는 개체의 혈장이 하나 이상의 표준 응고 시험에서 비정상적인 응고 프로필을 명시하는 상태를 의미한다. 특히, 응고성 저하는 혈전을 형성하는 변경된 능력의 결과로 과도하거나 장기간 출혈을 일으킬 수 있는 혈액의 감소되거나 결손된 응고를 의미한다.

[0130] 또한, 본 발명은 과도한 APC 생성 또는 항응고제 또는 APC 투여에 기인하는 출혈을 치료하거나 예방하기 위한, FVa, 바람직하게는 APC 내성 FVa 단독 또는 FVIIa, 예를 들면, NovoSeven® 또는 이의 다른 변이체, 예를 들면, 향상된 반감기 또는 활성을 갖는 것과의 병용 사용에 관한 것이다. 본원에 제시된 바와 같이, 본 발명자들은 당해 FVa가 단독으로 또는 FVIIa와 함께 트롬빈 생성의 APC-유도 감소를 억제하거나 역전시키고, 이에 기초하여 출혈 대상체를 치료하거나 과도한 APC 생성(예를 들면, 심각한 손상 및 출혈성 쇼크로부터 생성되는) 또는 APC 또는 다른 항응고제 투여에 의해 유도되는 출혈을 예방하기 위해 사용될 수 있다는 것을 입증했다.

[0131] 본 발명의 방법 및 조성물은 특히 대상체, 예를 들면, 헤파린, 쿠마린 유도체, 예를 들면, 와파린 또는 디쿠마롤, TFPI, AT III, APC, 루푸스 항응고제, 선충 항응고제 펩타이드(NAPc2), FVIIa 억제제, 활성 부위 차단된 FVIIa(FVIIai), 활성 부위 차단된 FIXa(FIXai), FIXa 억제제, 폰다파리누스, 이드라파리누스, DX-9065a, 리바록사반, 아픽사반, 에독사반, 에녹사파린 및 라작사반(DPC906)을 포함하는 FXa 억제제, 활성 부위 차단된 FXa(FXai), APC 및 유도체를 포함하는 FVa 또는 FVIIa의 억제제, 가용성 트롬보모듈린, 히루딘, 비발리루딘, 아르가트로반, 다비가트란 또는 지멜라가트란을 포함하는 트롬빈 억제제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 항응고제 처리된 대상체에서 항응고제의 효과를 역전시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체에서 항응고제는 FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXIII, FII, FXI, FXII, 폰 빌레브란트인자, 프레칼리크레인 또는 고분자량 키니노겐(HMWK)에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 응고 인자에 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편에 대한 대안으로서, 항응고제는 응고 단백질에 결합하여 이의 활성화 또는 다른 응고 단백질 또는 세포 표면과의 이의 상호작용을 억제하는 작은 약물형 분자, 펩타이드 또는 앵타머일 수 있다.

[0132] 추가로, 특정 국면에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 혈액 응고 인자(예를 들면, FV, FVIII, 프로트롬빈, 트롬보모듈린, 단백질 C 및 단백질 S, 항트롬빈, 호모시스테인 또는 지단백질(a))가 부재하고, 정상 수준보다 낮게 존재하거나 다형성의 유전적 돌연변이로 인한 손상된 기능과 함께 정상 수준으로 존재하는 유전적 응고 장애를

갖는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 치료 대상체는, 예를 들면, 혈액 응고 인자의 감소된 합성, 보호자 단백질(들)의 돌연변이, 비정상적인 번역후 처리, 단백질 분해 저하, 강화된 클리어런스, 혈액 응고 인자 또는 혈액 응고 인자의 손상된 활성화에 대한 항체에 의해 유도된 후천적 또는 유전적 응고 장애를 가질 수 있다. 특정 국면에서, 후천적 또는 유전적 응고 또는 출혈 장애에서 영향을 받는 혈액 응고 인자는 FV, FVIII, FIX 또는 FX이다. 다른 특정 국면에서, 후천적 또는 유전적 출혈 장애는 가용성 트롬보모듈린 및 이의 단편의 증가된 수준과 관련된 유전적 돌연변이로부터 발생한다. 예를 들면, 트롬보모듈린 중 Cys537 중지 돌연변이는 단백질 C의 정상 활성화보다 높게 중재하는 가용성 트롬보모듈린의 증가된 수준을 유도하고, 따라서 APC-매개된 출혈을 유도한다(참조: Langdown 등, Blood 2014 124(12): 1951-6 (2014), 이의 개시 내용은 명백하게 본원에 참조로 인용된다).

[0133] 또한, 본 발명의 방법은 FVIII 결손 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있고, 당해 방법은 FVIII 또는 응고촉진 바이패싱제를 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 FVIII 제품은 모두 상업적으로 이용가능한 혈장 유도된 제조합 FVIII 제품이다. 적합한 바이패싱제는 활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물, 예를 들면, FEIBA VH 면역(박스터 바이오사이언스, 비엔나, 오스트리아) 또는 rhFVIIa(NovoSeven®, 노보 노르디스크, 덴마크) 또는 다른 FVIIa 변이체 또는 mutein이다. 환자는 또한 FVIII에 대한 억제제 항체를 가질 수 있다. 전형적으로, 억제제 환자는 바이패싱제, 예를 들면, FEIBA 또는 rhFVIIa로 처리된다. 이러한 억제제 환자는 5BU보다 큰 고역가 반응 또는 0.5 내지 5BU의 저역가 반응 중 하나를 가질 수 있다. 임상 목적을 위해, 항체 반응의 크기는 베테스다 단위(BU) 억제제 역가가 수득될 수 있는 기능적 억제제 검정의 실행을 통해 정량화될 수 있다. 고역가 반응의 혈전증 및 지혈의 국제 학회(ISTH) 정의는 >5BU이고, 저역가 반응의 이의 정의는 0.5 내지 5BU이다. FVIII에 대한 항체 반응의 크기는 문헌(참조: Kasper C K 등 (1975) Proceedings: A more uniform measurement of FVIII inhibitors. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34(2):612)에 기재된 것과 같은 기능적 억제제 검정을 사용하여 정량화할 수 있다.

[0134] 일부 구현예에서, 치료 대상체는 FIX 결핍될 수 있고, 당해 방법은 FIX를 투여함을 추가로 포함할 수 있다. FIX를 포함하는 모든 상업적으로 사용가능한 제조합 혈장 유래 FIX-제품은 적합할 수 있고, Bebulin VH® FIX 복합체(박스터 바이오사이언스, 비엔나, 오스트리아)이다. 본 발명의 이 구현예에서, 환자는 FIX에 대한 억제제 항체를 가질 수 있다. FIX 억제제는 카스퍼(상기)에 의해 기재된 바와 같은 aPTT 검정으로 정량화할 수 있었다. 적합하게는, rhFVIIa(NovoSeven®) 및/또는 FEIBA는 또한 FIX 결핍 대상체에게 투여된다.

[0135] 본 발명에 사용된 FVa 및 FVIIa 조성물은 바람직하게는 이들 인자들을 임상 용도에 적합한 형태로 제형화하고/하거나 저장 안정성을 유지시키는데 적합한 것으로 당해 기술 분야에 공지된 하나 이상의 부형제를 함유한다. 예를 들면, 본 발명에 사용하기 위한 조성물을 함유하는 FVa (바람직하게는 APC 내성 FVa) 및/또는 FVIIa (바람직하게는 rhFVIIa(NovoSeven®))은 문헌(참조: "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), the "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), and Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000)에 기재된 것과 같은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 을 포함할 수 있다. 예시적 부형제는, 제한 없이, 탄수화물, 무기 염, 향균제, 산화방지제, 계면활성제, 완충제, 산, 염기 및 이의 조합을 포함한다. 주사가능한 조성물에 적합한 부형제는 물, 알코올, 폴리에틸렌 글리세린, 식물성 오일, 인지질 및 계면활성제를 포함한다. 탄수화물, 예를 들면, 당, 유도체화 당, 예를 들면, 알디톨, 알도산, 에스테르화 당 및/또는 당 중합체가 부형제로서 존재할 수 있다. 구체적인 탄수화물 부형제는, 예를 들면, 다음을 포함한다: 단당류, 예를 들면, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예를 들면, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예를 들면, 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예를 들면, 만니톨, 크실리톨, 말티톨, 락티톨, 크실리톨, 소르비톨 (글루시톨), 피라노실 소르비톨, 미오이노시톨 등. 부형제는 또한 무기 염 또는 완충제, 예를 들면, 시트르산, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 질산칼륨, 1가 인산나트륨, 2가 인산나트륨, 및 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0136] 본 조성물 중의 바람직한 부형제 또는 담체는 CaCl₂, 소 혈청 알부민 또는 인간 혈청알부민, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0137] 조성물에 함유된 FVa 및 FVIIa의 양은 다수의 인자에 따라 달라질 수 있지만, 최적으로 조성물이 단위 투여 형태 또는 용기(예를 들면, 바이알)에 존재할 경우 트롬빈의 생성을 상승적으로 촉진함으로써 출혈의 억제 및 응고의 촉진에 대한 상승 효과를 유도하는 치료적 유효량일 것이다.

[0138] 본 발명의 조성물은 임의로 하나 이상의 추가의 제제, 예를 들면, 지혈제, 다른 혈액 인자, 또는 상태 또는 질환에 대한 대상체를 치료하기 위해 사용되는 다른 약물을 포함할 수 있다. 하나 이상의 혈액 인자, 예를 들면, FXI, FVIII, FIX, FX, FXIII, FII, 및 폰 빌레브란트 인자를 포함하는 배합 제제가 특히 바람직하다. 제제는 또한 프레칼리크레인, 고분자량 키니노겐(HMWK) 및/또는 인자 XII를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 또한 다른 응고촉진제, 예를 들면, FXa, FIXa, FXIa, FXIIa 및 칼리크레인을 포함하나, 이에 한정되지 않는 내인성 응고 경로의 활성화제; 또는 조직 인자, 트롬빈 및 FXa를 포함하나, 이에 한정되지 않는 외인성 응고 경로의 활성화제를 포함할 수 있다.

[0139] 각각 FVa 및 FVIIa 중 하나 또는 모두를 포함하는 조성물 또는 조성물들은 전형적으로 반드시 아니지만 경구, 주사(피하, 정맥내 또는 근육내)를 통해, 주입으로 또는 국소 투여된다. 약제학적 제제 또는 조성물은 투여 직전에 액체 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있지만, 또한 시럽, 크림, 연고, 정제, 캡슐, 분말, 겔, 매트릭스, 좌제 등의 다른 형태를 취할 수 있다. 추가의 투여 방식, 예를 들면, 폐, 직장, 경피, 경점막, 경막내, 심장막, 동맥내, 뇌내, 안구내, 복강내 등이 또한 고려된다. 각각의 약제학적 조성물은 당해 분야에 공지된 임의의 의학적으로 허용되는 방법에 따라서 동일하거나 상이한 투여 경로를 사용하여 투여할 수 있다.

[0140] 전형적으로, FVa 및 FVIIa는 서로 동시에 투여되고, 동일하거나 상이한 조성물에 존재할 수 있다. 그러나, 주어진 바와 같이, 이러한 잔기들은 상이한 시간에 투여될 수 있고, 이러한 투여는 어느하나의 순서로 수행될 수 있다. 본 출원에 함유된 정보에 기초하여, 당업자는 목적하는 효과, 바람직하게는, 예를 들면, 유전적 장애, 후천적 상태의 결과 또는 과도한 APC 생성 또는 APC 투여의 결과로서 출혈의 예방 또는 치료에 대한 상승 효과를 달성하기에 적합한 투여량을 선택할 수 있다. 투여량 및 투여 섭생은 치료될 특정 출혈 장애, 치료 대상체의 나이와 건강, 수행될 임의의 다른치료 등과 같은 인자에 따라 달라진다.

[0141] 대상체 조합이 응고성 저하 또는 출혈을 치료하거나 예방하는데 사용되는 상이한 징후에 대한 예시적인 투여 계획은 아래에 제시된다. 이러한 섭생은 예시적이고, 본 발명에 의해 치료될 적절한 투여 계획 및 출혈 상태를 망라하는 것이 아님을 의도하는 것으로 이해되어야 한다.

수퍼FVa* (단일 투여)	저용량	중간 용량	고용량
용량 범위(μ g/mL 혈장)	약 0.006-0.6	약 0.6-6.0	약 6-60
용량 범위 (μ g/kg 체중)*	약 0.27-27	약 27-270	약 270-2700

FVIIa (단일 투여)	저용량	중간 용량	고용량
용량 범위(μ g/mL 혈장)	약 0.006-0.06	약 0.06-0.6	약 0.6-6 [#]
용량 범위 (μ g/kg 체중)	약 0.27-2.7	약 2.7-27	약 27-270 [#]

aPCC 농축물(예: FEIBA) (단일 투여)	저용량	중간 용량	고용량
용량 범위 (단위/kg 체중)	약 1-25	약 25-50	약 50-100

혈장 용적 = 45 mL/kg 체중이라는 사실에 기초하여 계산.

6 μ g/mL 또는 270 μ g/kg 체중의 용량 상한치는 일부 의사가 비반응자에서 향상된 효능을 위한 경우에 FVIIa(90 μ g/kg) 3배(270 μ g/kg)의 표지된 용량을 초과한다는 사실에 기초하여 선택되었다.

[0142]

[0143] 예시적 투여 섭생

[0144] 1) 급성 출혈: 저용량, 중간 용량 또는 고용량의 수퍼FVa 단독 또는 저용량, 중간 용량 또는 고용량의 FVIIa 또

는 aPCC 또는 PCC 또는 3-인자 PCC 또는 4-인자 PCC 또는 FEIBA 또는 신선 동결 혈장의 단일 투여와 함께 급성 출혈에 대한 최적 반응까지 동시에 또는 교호로 반복하여 단일 용량 비경구 투여. 투여 간격은 동시에 또는 교호로 2시간 마다 내지 4시간 마다 내지 8시간 마다 내지 12시간 마다내지 24시간 마다 내지 48시간 마다 내지 72시간 마다로 걸쳐 있다.

[0145] 2) 급성 출혈: 0.0001-2700 $\mu\text{g/kg}$ 체중/시간의 ^{수퍼}FVa 단독 또는 저, 중간 또는 고용량의 FVIIa 또는 aPCC의 단일 용량 주입과 함께 연속 주입 또는 연속 비경구 투여. FVIIa 또는 aPCC 또는 PCC 또는 3-인자 PCC 또는 4-인자 PCC 또는 FEIBA 또는 신선 동결 혈장의 투여 간격은 급성 출혈의 최적 반응까지 2시간 마다 내지 4시간 마다 내지 8시간 마다 내지 12시간 마다 내지 24시간 마다 내지 48시간 마다 내지 72시간 마다로 걸쳐 있다.

[0146] 3) 급성 출혈: FV 라이텐- 또는 FV 캄브리지- 또는 FVIII- 또는 FIX- 또는 FX- 제품과 함께 1) 또는 2)에서와 동일. FVIII- 또는 FIX- 또는 FX- 제품의 경우, 급성 출혈의 최적 반응까지 약 1-300 단위/kg 체중으로 단일 용량 주입 또는 비경구 투여. 투여 간격은 동시에 또는 교호로 2시간 마다 내지 4시간 마다 내지 8시간 마다 내지 12시간 마다내지 24시간 마다 내지 48시간 마다 내지 72시간 마다로 걸쳐 있다.

[0147] 4) 출혈 예방 또는 출혈 방지: 저용량, 중간 용량 또는 고용량의 ^{수퍼}FVa 단독 또는 저용량, 중간 용량 또는 고용량의 FVIIa 또는 aPCC 또는 PCC 또는 3-인자 PCC 또는 4-인자 PCC 또는 FEIBA 또는 신선 동결 혈장의 단일 용량과 함께 동시에 또는 교호로 단일 용량 비경구 투여. 예방적 사용을 위한 투여 간격은 동시에 또는 교호로 8시간 마다 내지 12시간 마다 내지 24시간 마다 내지 48시간 마다 내지 72시간 마다 내지 매주로 걸쳐 있다.

[0148] 본 발명의 특정 국면에서, ^{수퍼}FVa는 다양한 출혈 장애 및 상태, 예를 들면, 혈우병, 외상성 출혈 및 NOAC-유래 출혈에 대한 단독 요법으로 투여된다. 이러한 상태를 치료하기 위한 단일 요법으로서 ^{수퍼}FVa의 예시적 투여 계획 및 범위는 아래에 제공된다:

[0149] 억제제를 갖는 혈우병에서, ^{수퍼}FVa의 용량은 약 4-2000U/kg 또는 약 0.01-8.0mg/kg, 바람직하게는 약 40-200U/kg 또는 약 0.1-0.8mg/kg이다.

[0150] 급성 외상성 응고 장애에서, ^{수퍼}FVa의 용량은 약 20-10,000U/kg 또는 약 0.06-35mg/kg, 바람직하게는 약 200-1000U/kg 또는 약 0.6-3.5mg/kg이다.

[0151] NOAC-매개된 출혈에서, ^{수퍼}FVa의 용량은 약 40-200U/kg 또는 약 0.1-0.8mg/kg이다.

[0152] 투여는 10분, 20분, 30분 또는 60분 동안 단일 볼러스 또는 볼러스 주입일 수 있다. 투여는 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 72시간, 96시간 동안 또는 출혈 에피소드 또는 응고 장애를 해결하기 위해 필요한 동안 연속 주입일 수 있다. 투여는 출혈 에피소드 또는 응고 장애를 해결하기 위해 필요한 한 2시간 마다, 4시간 마다, 6시간 마다, 8시간 마다, 10시간 마다, 1일 2회, 1일 1회, 격일로, 1주일에 2회 또는 1주일에 1회 반복되거나 예방적 또는 방지적 치료로서 사용될 때 무한으로 단일 볼러스 또는 볼러스 주입일 수 있다.

[0153] 본 발명의 다른 국면에서, ^{수퍼}FVa는 다양한 출혈 장애 및 상태, 예를 들면, 혈우병, 외상성 출혈 및 NOAC-유래 출혈을 위해 병용 요법으로 다른 약제학적 활성제와 함께 투여된다. 병용 요법으로 사용될 때 ^{수퍼}FVa의 예시적 투여 계획 및 범위는 아래에 제공된다:

[0154] 예를 들면, 병용 요법으로 사용되는 경우, ^{수퍼}FVa의 용량은 임상 용량의 FVIIa(90 $\mu\text{g/ml}$) 또는 높은 임상 용량의 FVIIa(270 $\mu\text{g/ml}$) 또는 임상 용량의 FEIBA(25-50U/kg)와 함께 사용될 때, 급성 외상성 응고 장애를 치료하기 위해 약 4-20U/kg 또는 0.01-0.08mg/kg, 바람직하게는 약 0.04-2U/kg 또는 약 0.001-0.008mg/kg; 급성 외상성 응고 장애를 치료하기 위해 약 20-100U/kg 또는 0.06-0.35mg/kg, 바람직하게는 약 2-10U/kg 또는 약 0.0006-0.035mg/kg; 또는 NOAC-매개된 출혈을 치료하기 위해 약 4-20U/kg 또는 0.01-0.08mg/kg, 바람직하게는 약 0.04-2U/kg 또는 약 0.001-0.008mg/kg일 수 있다.

[0155] 또는, 억제제를 갖는 혈우병 및/또는 NOAC-매개된 출혈을 치료하기 위해, 약 40-200U/kg 또는 0.1-0.8mg/kg, 바람직하게는 약 4-20U/kg 또는 약 0.01-0.08mg/kg, 더욱 바람직하게는 약 0.4-2U/kg 또는 약 0.001-0.008mg/kg, 가장 바람직하게는 약 0.04-0.2U/kg 또는 약 0.0001-0.0008mg/kg의 ^{수퍼}FVa 용량은 약 90-270 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게

는 약 9-27 $\mu\text{g/ml}$, 더욱 바람직하게는 약 0.9-2.7 $\mu\text{g/ml}$, 가장 바람직하게는 약 0.009-0.27 $\mu\text{g/ml}$ 의 FVIIa; 또는 약 25-50U/kg, 바람직하게는 2.5-5.0U/kg, 더욱 바람직하게는 약 0.25-0.5U/kg, 가장 바람직하게는 약 0.025-0.05U/kg의 FEIBA; 또는 약 1-100U/kg, 바람직하게는 약 0.1-10U/kg, 더욱 바람직하게는 약 0.01-1U/kg, 가장 바람직하게는 약 0.001-0.1U/kg의 PCC와 함께 투여될 수 있다.

[0156] 추가로, 급성 외상성 응고 장애를 치료하기 위해, 약 200-1000U/kg 또는 약 0.6-3.5mg/kg, 바람직하게는 약 20-100U/kg 또는 약 0.06-0.35mg/kg, 더욱 바람직하게는 약 2-10U/kg 또는 약 0.006-0.035mg/kg, 가장 바람직하게는 약 0.2-1U/kg 또는 약 0.0006-0.0035mg/kg의 ^{수퍼}FVa 용량은 약 90-270 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 약 9-27 $\mu\text{g/ml}$, 더욱 바람직하게는 약 0.9-2.7 $\mu\text{g/ml}$, 가장 바람직하게는 약 0.009-0.27 $\mu\text{g/ml}$ 의 FVIIa; 또는 약 25-50U/kg, 바람직하게는 2.5-5.0U/kg, 더욱 바람직하게는 약 0.25-0.5U/kg, 가장 바람직하게는 약 0.025-0.05U/kg의 FEIBA; 또는 약 1-100U/kg, 바람직하게는 약 0.1-10U/kg, 더욱 바람직하게는 약 0.01-1U/kg, 가장 바람직하게는 약 0.001-0.1U/kg의 aPCC와 함께 투여될 수 있다.

[0157] 본 발명의 또 다른 국면에서, ^{수퍼}FVa를 포함하는 병용 요법은 또한 ^{수퍼}FVa 및 제2의 약제학적 활성제, 예를 들면, FVIIa, FEIBA 및 aPCC의 교호 투여를 포함한다. 예를 들면, ^{수퍼}FVa가 ^{수퍼}FVa와의 상승작용을 위한 이의 농도로 저하시키기 위한 FVIIa의 천연 "위시아웃 기간"을 이용하기 위해 FVIIa의 임상 용량 후 1시간, 2시간, 4시간 또는 6시간에 투여될 수 있을 때이다.

[0158] 본 발명은 또한 ^{수퍼}FVa, 바람직하게는 서열번호 4와 90% 서열 동일성을 갖는 ^{수퍼}FVa, 더욱 바람직하게는 서열번호 4와 95% 서열 동일성을 갖는 ^{수퍼}FVa, 가장 바람직하게는 서열번호 4의 ^{수퍼}FVa를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 본 발명은 ^{수퍼}FVa를 코딩하는 단리된 핵산을 함유하는 숙주 세포, 예를 들면, 박테리아, 효모, 포유동물 세포를 포함한다. 따라서, 본 발명은 FV 생산에 적합한 조건하에 핵산을 함유하는 숙주 세포를 배양하고, 임의로 상기한 FV의 활성화 형태를 단리시키고 정제함을 포함하는, FV, 예를 들면, 서열번호 4의 ^{수퍼}FV의 활성화 형태의 재조합 생산 방법을 추가로 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0159] 본 발명은 상세히 기재되었다. 본 발명 및 이의 고유의 이점을 추가로 설명하기 위해, 본 발명자에 의해 수행된 실험을 논의하는 다음 실시예가 제공된다.

[0160] 작업 실시예

[0161] 실시예에 사용된 재료 및 방법

[0162] **재료**

[0163] 정상 풀링 인간 혈장 및 억제제(베테스다 단위(BU)로 구체화된 역가)를 포함하고 포함하지 않는 인간 FVIII-결핍 환자의 혈장은 조지 킹 바이오-메디칼(George King Bio-Medical)(오버랜드 파크, 캔자스주, 미국)로부터 구입했다. 또한, 혈장 및 임상 정보는 고지에 입각한 동의서를 취득한 후 샌디에고 캘리포니아 대학(UCSD)의 혈우병 치료 센터를 정기적으로 방문하여 니메켄 검정 (17)을 사용하여 임상 실험실에 의해 심각한 FVIII-결핍 (<1% 고유 FVIII-활성 수준) 및 억제제(BU로 측정된 역가)를 갖는 두 환자로부터 취득했다. 환자 비밀 보호, 샘플 및 데이터 수집 방법은 UCSD 임상 시험 심사위원회에 의해 승인되었다. 혈액은 9:1 혈액/항응고제 용적 비로 3.8% 나트륨 시트레이트(pH 5.5)에서 인출하고, 즉시 처리했다. 혈장을 수집하고, 2600 × g에서 15분 동안 원심분리 후 -80° C에서 동결시켰다. 다음 시약이 사용되었다: 엔자임 리서치 라보라토리즈로부터 트롬빈(사우스 밴드, 인디애나, 미국), 칼바이오펜으로부터 히루딘(샌디에고, 캘리포니아, 미국), 엔자임 리서치 라보라토리즈로부터 옥수수 트립신 억제제(CTI), 시냅스 BV(다이아그노스틱스 스타고에 의해 분포됨)로부터 트롬빈 보정이기, 바켄(부벤도르프 스위스)으로부터 기질 Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 재조합 인간 조직 인자(TF), 데이드 베링(뉴워크 텔라웨어 미국)에서 Dade Innovin, 그린 마우틴 항체(벌링턴, 버몬트, 미국)에서 마우스 항-인간 FVIII(GMA8015) 및 동형 항체(GMA650), 노보노르디스크(마그스바도, 덴마크)로부터 재조합 인간 FVIIa, NovoSeven®, 인지질 소세포(80% 포스파티딜콜린(PC), 20% 포스파티딜세린(PS))는 아벤티 리피즈(알라바스터, 앨라바마, 미국)로부터 구입하고, 기재된 바와 같이 제조했다(18).

[0164] **단백질 제조**

[0165] 재조합 수퍼 인자 5 (^{수퍼}FV) (M.wt. 174kDa)는 B-도메인 삭제된 S2183A FV 플랫폼에서 제조하고, 기재된 바와 같이(16) 항-FV 3B1 및 HV5101 모노클로날 항체를 사용하여 친화도 크로마토그래피의 조합으로 안정한 형질감염

된 BHK 세포의 조정 배지로부터 정제했다. 수퍼FV 단백질 농도는 제조업자의 지침에 따라서 FV ε 1%=16.9(DNASTAR Lasergene (Madison, WI)을 사용하여 아미노산 조성 및 MW 174kDa에 기초하여 계산됨) 및 ELISA (엔자임 리서치 라보라토리즈)를 사용하여 280nm에서 흡광도로 측정했다. 수퍼FV 단백질은 프로트롬비나제 완충제 (50mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% BSA, 5mM CaCl₂ 및 0.1mM MnCl₂)에서 37 °C에서 20분 동안 2nM 트롬빈으로 활성화했다. 활성화는 1.1 몰 당량의 히루딘의 첨가로 종결시켰다.

[0166] **활성화 단백질 C(APC)**

[0167] 인간 재조합 또는 혈장 유래 APC, 및 무린 재조합 APC를 상이한 실험에서 나타낸 바와 같이 사용했다. APC의 인간 공급원의 경우, 재조합 인간(rh) APC(Xigris®, Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA)를 사용하고, 제조업자의 사양에 따라 재구성했다. 재조합 무린 APC를 정제하고 이미 기재된 바와 같이(5) 제조했다.

[0168] **트롬빈 생성 검정**

[0169] 내생적 트롬빈 잠재력(ETP) 검정은 기재된 바와 같이(19) 실시했다. 간단하게, CTI, TF, PCPS 소포 및 응고 인자로 보충된 혈장 샘플은 37 °C에서 혈장으로 예비배양했다. 트롬빈 생성은 HBS/0.5% BSA에 CaCl₂ 및 Z-Gly-Gly-Arg-AMC를 첨가하여 개시했다. 최종 반응 혼합물은 총 용적 100 μ L로 50% 혈장, 0.2pM TF, 4 μ M PCPS 소포, 0.725 μ M CTI, 0.5mM Z-GGR-AMC 및 7.6mM CaCl₂를 함유했다. 일부 실험에서, 1.25 μ g/ml 항-FVIII 항체를 혈장에 첨가하고, ETP는 1시간 예비배양 후 측정했다. 형광은 제미니 EM 형광 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 360/460nm의 여기/발광 파장에서 측정했다. 형광 시험 경과 데이터는 기재된 바와 같이(20) nM 트롬빈으로 전환시켰다. 곡선하 면적(AUC)으로서 정의된 ETP 및 피크 높이는 오리진 또는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 측정했다.

[0170] FVIII-결핍 혈장에 첨가된 FVIII의 BU 역가 값은 변형된 니이메겐 베테스다 검정을 사용하여 측정했다(참조: Barrow and Lollar; JTH 2006, 4:2223-2229). 간단하게, 항체는 0.05% 트윈 80을 갖는 HBS에서 연속 희석하고, 100mM 이미다졸, pH 7.0로 보충된 폴링된 정상 혈장과 1:1 혼합했다. 샘플을 37 °C에서 2시간 동안 배양한 후, APTT XL 시약(Pacific Hemostasis)과 함께 aPTT로 검정했다. 표준 곡선은 또한 HBST와 1:1 혼합되고 37 °C에서 2시간 동안 배양된 FVIII 결핍 혈장에서 정상 혈장의 연속 희석으로부터 유도했다. 퍼센트 FVIII 활성을 mg/ml의 항체에 대해 플롯팅하고, 잔류 활성의 50%는 1BU/ml로서 정의했다. 또한, 내인성 트롬빈 잠재력(ETP) 검정은 기재된 바와 같이(3) 실행했다. 간단하게, FVa 돌연변이 또는 생리 식염수를 1.45 μ M 옥수수 트립신 억제제(Haematologic Technologies), 10mM CaCl₂, 10 μ M 인지질 소포(80% 포스파티딜콜린, 20% 포스포티딜세린, 기재된 바와 같이(6) 제조됨, 0.2pM 가용성 조직 인자(Innovin®, Dade Behring), 및 HBS 중의 0.4mM Z-Gly-Gly-Arg-AMC(트롬빈 기질, Bachem)로 보충된 인간 또는 무린 혈장(George King Bio-Medical; 마우스 공급원, 50% v/v)에 첨가했다. 혼합 후, 100 μ L를 형광을 모니터링하기 위해 37 °C에서 FluoroNunc 미세역가 플레이트로 옮겼다(360nm에서 여기/460nm에서 발광; 제미니 EM 형광 플레이트 판독기(Molecular Devices)). 형광 시간 경과 데이터는 기재된 바와 같이(7) nM 트롬빈으로 전환시켰다. 곡선하 면적으로 정의된 ETP는 프리즘 5.04(그래프패드)를 사용하여 측정했다.

[0171] **FVa 불활성 검정**

[0172] FVa의 APC-매개된 불활성화는 ETP 검정 및 aPTT 응고 검정에서 분석했다. FVa 돌연변이는 인간 및 무린 Balb/c 혈장 중의 재조합 인간 APC(Xigris®) 또는 완충제의 동일 용적으로 배양했다.

[0173] **APTT 응고 검정**

[0174] 혈장(50 μ L)을 50 μ L의 aPTT 시약(APTT-XL, Pacific Hemostasis)과 혼합하고, 재조합 인간 APC 또는 완충제를 갖는 FVa의 존재하에 37 °C에서 3분 동안 배양했다. HBS, 0.5% BSA 중의 25 μ L의 50mM CaCl₂의 첨가 후, 응고 시간은 ST4 응고측정기(Diagnostica Stago)를 사용하여 기록했다.

[0175] **생체의 aPTT 응고 검정**

[0176] 재조합 무린 APC를 20 μ L 나트륨-시트레이트(3.8%)를 미리 충전한 실리코화 마이크로모세관(75 μ L)에서 안와후 혈액 수거 2분 전에 꼬리 정맥 주사로 Balb/c 마우스에 정맥내 투여했다. 전혈 aPTT를 즉시 실행하고, 이에 의해 50 μ L의 혈액을 50 μ L의 aPTT 시약(APTT-XL, Pacific Hemostasis)과 혼합하고, FVa 또는 완충제의 존재하에 37 °C에서 3분 동안 배양했다. HBS, 0.5% BSA 중의 25 μ L의 130mM CaCl₂의 첨가 후, 응고 시간은 ST4 응고측정

기(Diagnostica Stago)를 사용하여 기록했다.

[0177] 꼬리 클립 출혈 검정

[0178] 마우스를 이소플루란 3%로 마취시키고, 온도 조절 가열 패드(37 °C)에 배치하고, 꼬리를 소정 용적의 37 °C 생리 식염수(0.9% NaCl)에 20분 동안 침지시킨 후 꼬리의 말단부를 1.5mm 직경으로 절단했다. 출혈 및 응고 안정성에 대한 효과를 연구하기 위해, 튜브를 제1 및 제2 10분 동안 별도로 혈액을 수집하기 위해 10분 후 변경했다. 혈액 손실은 2% 아세트산에 의한 적혈구 용해 후 생리 식염수 용액 중 헤모글로빈 농도로 측정하고, 490nm에서 흡광도로 측정했다. 규정된 혈액 용적으로부터 유도된 헤모글로빈 표준을 사용하여, 혈액 손실을 46%의 적혈구 용적을 가정하여 계산하고, $\mu\text{L/g}$ 체중으로 나타냈다. Balb/c 마우스 그룹은 rhAPC(Xigris®)의 정맥내 주사 2분 전에 동일 용적(200 μL)의 ^{수퍼}FVa 또는 생리 식염수로 정맥내(꼬리 정맥) 주사했다. APC 주사 직후, 꼬리 절단을 실행했다. 모든 제제는 주사용 멸균 염화나트륨 0.9%(Hospira Inc)로 희석시켰다.

[0179] 간 열상 출혈 검정

[0180] 마우스를 이소플루오란 3%로 마취하고, 복부는 흉골 무늬 중선 절개로 개방했다. 간을 동원하고, 완전한 복부 및 지느러미 열상을 유도하는 좌측 간 엽을 통해 규정된 10mm 메스절단에 의해 멸균 거즈 상에서 표면화했다. 열상 직후, 마우스를 생리 식염수(37 °C, 13mL)로 충전된 작은 칭량 접시(8cm 직경)에 경향 배치하고, 가열 패드(37 °C)에 얹혀 있는 마취 챔버로 옮겼다. 마취는 3% 이소플루오란으로 유지시키고, 접시를 별도로 제1 및 제2의 10분 동안 혈액을 수집하기 위해 10분 후에 변경했다. 혈액 손실은 꼬리 클립 모델에 대해 기재된 바와 같이 측정했다. Balb/c 마우스 그룹은 간 열상 직후 혈장 유래 인간 APC의 정맥내 주사 2분 전에 동일 용적의 (200 μL)의 ^{수퍼}FVa 또는 생리 식염수를 정맥내(꼬리 정맥) 주사했다. 모든 제제는 주사용 멸균 염화나트륨 0.9%(Hospira Inc)로 희석시켰다.

[0181] 통계 분석

[0182] 양측 스튜던츠 시험을 적절한 경우 통계적 유의성을 평가하는데 사용했다. ≤ 0.05 의 p-값은 통계적으로 유의하다고 간주했다.

[0183] 실시예 1

[0184] 이 실시예는 결과가 도 1a 및 1b에 함유된 실험에 관한 것이다. 이러한 실험은 FVIII-결핍 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 예시한다. 이러한 실험에서, 트롬빈 생성은 고정 농도의 rhFVIIa (NovoSeven®, 25ng/mL)의 부재 또는 존재하에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa로 보충된 FVIII-결핍 혈장에서 ETP 및 피크 높이로서 측정했다. 도면에서 패널 (A)는 rhFVIIa의 부재(상부 패널) 또는 존재하(하부 패널)에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa에서 ETP의 대표적인 예이다. 패널 (B)는 rhFVIIa의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa로 달성된 ETP(내생적 트롬빈 잠재력)의 양(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)를 도시한다. 도면에서, 오차 막대는 평균($n \geq 5$)의 표준 오차를 나타낸다. 이러한 결과는 통계적으로 ETP 및 피크 높이에 대한 조합의 상승 효과 및 이에 기초하여 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 입증한다.

[0185] 실시예 2

[0186] 이 실시예는 결과가 도 2a 및 2b에 함유된 실험에 관한 것이다. 이러한 실험은 FVIII-결핍 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 추가로 나타낸다. 실험에서, 트롬빈 생성은 고정 농도의 ^{수퍼}FVa (0.59 $\mu\text{g/mL}$)의 부재 또는 존재하에 증가하는 농도의 rhFVIIa (NovoSeven®)으로 보충된 FVIII-결핍 혈장에서 ETP 및 피크 높이로서 측정되었다. 패널 (A)는 ^{수퍼}FVa의 부재(상부 패널) 또는 존재하(하부 패널)에 증가하는 농도의 rhFVIIa에서 ETP의 대표적인 예를 함유한다. 패널 (B)는 ^{수퍼}FVa의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 rhFVIIa로 달성된 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)를 나타낸다. 오차 막대는 다시 평균($n \geq 5$)의 표준 오차를 나타낸다. 이러한 결과는 또한 통계적으로 ETP 및 피크 높이에 대한 조합의 상승작용 효과 및 이에 기초하여 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 입증한다.

[0187] 실시예 3

[0188] 본 실시예는 결과가 도 3a 및 3b에 함유된 실험에 관한 것이다. 이러한 실험은 항-FVIII 항체(억제제)를 갖는

정상 인간 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 추가로 입증한다. 트롬빈 생성은 1.25 µg/ml 항-인간 FVIII-항체로 보충된 정상 인간 혈장에서 ETP(상부 패널) 및 피크 높이(하부 패널)로서 다시 측정되었다. 패널 (A)는 고정 용량의 rhFVIIa(NovoSeven®, 25ng/ml) 농도의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa에 의한 트롬빈 생성을 나타낸다. 패널 (B)는 고정 용량의 ^{수퍼}FVa의 부재(검은색 곡선) 또는 존재하(적색 곡선)에 증가하는 농도의 rhFVIIa에 의한 트롬빈 생성을 나타낸다. 내생적 트롬빈 잠재력; ETP. ^{수퍼}FVa; SFVa. 오차 막대는 다시 평균(n≥5)의 표준 오차를 나타낸다. 이러한 결과는 또한 통계적으로 ETP 및 피크 높이에 대한 조합의 상승작용 효과 및 이에 기초하여 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 입증한다.

[0189] 실시예 4

[0190] 이 실시예는 결과가 도 4a 및 4b에 함유된 실험에 관한 것이다. 이러한 실험은 추가로 선천적 FVIII-결핍 및 고역가 항-FVIII 항체(억제제)를 갖는 환자의 혈장에서 FVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 예시한다. 특히, ^{수퍼}FVa 및/또는 rhFVIIa의 응고촉진 효과를 또한 선천적 FVIII-결핍 및 억제제를 갖는 환자에서 연구했다. 고역가 억제제를 갖는 환자로부터 2개의 임상 수집된 및 3개의 상업적 혈장 샘플의 ETP(임상 샘플 BU-역가 = 모든 환자에 대해 64; 상업적 샘플 BU-역가 = 41, 150 및 280)를 기준선에서 2개의 상이한 농도의 ^{수퍼}FVa 또는 rhFVIIa, 또는 둘 다의 조합의 존재하에 연구했다. 결과는 NHP의 ETP와 비교했다(도 4a/b). RhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa는 모두 5명 환자 샘플에서 ETP 및 피크 높이를 증가시켰다. ETP 및 피크 높이는 40nM rhFVIIa(치료 농도의 rhFVIIa) 및 3.3nM에서 ^{수퍼}FVa로 스파이킹된 혈장 사이에서 필적할 만 했다. 인자 치환에 대한 개체간 반응에도 불구하고, ETP 및 피크 높이는 rhFVIIa(40nM; 치료 농도) 및 ^{수퍼}FVa(3.3nM)이 배합될 때 모든 환자 샘플에서 현저하게 증가되어 어느 하나의 인자 단독에 비교하여 약 1.5배 내지 3배 증가를 입증했다. rhFVIIa의 농도를 3.3nM의 ^{수퍼}FVa의 존재하에 40nM로부터 2nM로 20배 저하시키면, ETP 및 피크 높이에 대한 효과는 40nM의 rhFVIIa와의 병용 요법과 필적할 만하게 잔류된다. 그러나, 단지 2nM rh FVIIa의 존재하에 ^{수퍼}FVa의 농도를 30nM로 증가시키면 다수의 환자 샘플에서 ETP 및/또는 피크 높이를 추가로 증가시키는 것으로 나타났다. 효과는 임상 수집된 샘플에서 가장 현저했고, 여기서 인자 조합으로, ETP는 정상 풀팅된 혈장의ETP에 필적할 만하게 되었다(도 4a).

[0191] 이러한 결과는 통계적으로 (증가된 ETP 및 피크 높이에 의해 입증된 바와 같이) 응고 또는 응혈 및 트롬빈 생성에 대한 조합의 상승 효과를 입증했다.

[0192] 실시예 5

[0193] 이 실시예는 결과가 도 5에 함유된 실험에 관한 것이다. 특히, ^{수퍼}FVa의 효과는 또한 급성 관절 또는 근육 출혈을 위해 90 µg/kg에서 rhFVIIa로 치료 직전 및 치료 5분 후에 선택적 FVIII-결핍 및 고역가 억제제를 갖는 2명의 상이한 환자(환자 A, BU=64; 환자 B, BU= 32)에서 직접 연구했다. rhFVIIa에 의한 치료는 두 환자에서 기준선에 비해 ETP 및 피크 높이의 약 1.5배 내지 2배 증가를 유도했다. 환자 혈장에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa의 생체의 첨가는 rhFVIIa 주입 전 및 주입 5분 후에 수거된 혈장에서 ETP 및 피크 높이의 추가의 약 3배 증가를 유도했다(도 5). 환자 A의 경우, 피크 높이가 아니라 ETP가 10nM ^{수퍼}FVa에서 안정화되었다.

[0194] 이러한 시험은 급성 관절 출혈을 위해 rhFVIIa (NovoSeven®)으로 치료된 선천적 FVIII-결핍 및 고역가 항-FVIII 항체를 갖는 환자의 혈장에서 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 예시한다. 혈액 샘플은 90 µg/kg에서 rhFVIIa의 주입 직전(검은색 곡선) 및 주입 5분 후(적색 곡선)에 수득했다. BU-역가=64 U/ml. 트롬빈 생성은 혈장 샘플에 생체의 첨가된 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa에 의한 ETP(상부패널) 또는 피크 높이(하부 패널)로서 측정되었다. 이러한 결과는 통계적으로 검출된 ETP 및 피크 높이에 기초하는 응고 또는 응혈 및 트롬빈 생성에 대한 상승 효과를 입증한다.

[0195] 실시예 6

[0196] 이 실시예는 결과가 도 8a 및 b에 함유된 응고 실험에 관한 것이다. 이 실험에서, 트롬빈 생성은 A) 뮤린 Balb/c 혈장 및 B) rhAPC의 존재하에 rhFVa 또는 rh ^{수퍼}FVa로 보충된 정상 인간 혈장에서 측정되었다. 트롬빈 생성은 곡선하 면적(AUC)(n=4-6)으로서 나타났다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성

(모든 p -값 < 0.001 을 나타낸다.

[0197] 실시예 7

[0198] 이 실시예는 결과가 도 9a, 9b 및 9c에 함유된 실험에 관한 것이다. 이러한 실험에서, aPTT 보정이 입증된다. 특히, 도 9에 도시된 바와 같이, aPTT 응고 시간은 A) 10 nM rhAPC ($n=4$)의 존재하에 증가하는농도의 rhFVa 또는 rh^{수퍼}FVa의 존재하에 인간 혈장에서 측정되었고, 도 9b에서 aPTT 보정은 10nM rhAPC 및 1nM rh FVa 변이체에서 단일 데이터 점으로서 묘사되고, 도 9c에서 aPTT 보정은 rhFVa 변이체($n=10$)의 존재하에 묶인 혈장을 사용하여 제시된다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p -값 < 0.001 을 나타낸다.

[0199] 실시예 8

[0200] 이 실시예는 결과가 도 10에 함유된 실험에 관한 것이다. 실험에서, aPTT 보정은 재조합 묶인 APC를 Balb/c 마우스에 정맥내 주사 후 FVa 변이체로 입증한다. 마우스는 생리 식염수 또는 rmAPC(0.5mg/kg)를 정맥내 주사했다. 2분 후, 혈액을 안와 후 수집했고, 전혈 aPTT를 즉시 측정했다. APC를 주사한 두 그룹의 마우스에서, 전혈은 두 변이체에 의한 aPTT 보정 정도를 측정하기 위해 ^{수퍼}FVa 또는 wt FVa(오픈 삼각형 1 U/mL, 오픈 원 0.5 U/mL, 밀폐 삼각형 0.05 U/mL)으로 생체의 스파이킹했다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p -값 < 0.001 을 나타낸다.

[0201] 실시예 9

[0202] 본 실시예는 결과가 묶인 꼬리 클립 모델에서 ^{수퍼}FVa에 의한 APC-유도 출혈의 보정을 입증하는 도 11a 및 11b에 함유된 실험에 관한 것이다. 야생형 마우스는 증가하는 용량의 rhAPC 또는 생리 식염수를 정맥내 주사했다. ^{수퍼}FVa는 2개의 농도로 APC 2분 전에 정맥내 주사했다. 꼬리 클립 후 출혈은 μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타낸다. 도 11a는 20분 동안 혈액 손실을 나타내고, 도 11b는 이것이 1^차 10분으로 나누어짐을 나타내고, 도 11c는 꼬리 클립이 도시된 후 2^차 10분을 나타낸다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. *는 통계적 유의성(p -값 < 0.05)을 나타낸다.

[0203] 실시예 10

[0204] 이 실시예는 결과가 도 12에 함유된 실험에 관한 것이다. 실험은 꼬리 클립 및 간 열상 후 출혈 패턴을 직접 비교한다. FVIII-결핍 마우스는 생리 식염수(200 μ L) 또는 rhFVIII(50U/kg; 200 μ L)을 정맥내 주사하고, 꼬리 클립 또는 간 열상을 실시했다. 야생형 Balb/c 마우스는 기준값의 생리 식염수를 주사했다. 20분 동안 모든 마우스 그룹에서 혈액 손실은 두 모델에서 측정했다.

[0205] 실시예 11

[0206] 이 실시예는 결과가 간 열상 후 ^{수퍼}FVa에 의한 APC-유도 출혈의 보정을 나타내는 도 13a 내지 c에 함유된 실험에 관한 것이다. 이러한 실험에서, 마우스는 1.25mg/kg에서 생리 식염수 또는 혈장 유래 인간 APC를 정맥내 주사했다. ^{수퍼}FVa를 3.5mg/kg에서 APC 직전 2분에 정맥내 주사했다. 간 열상 후 출혈은 μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타낸다. 도 13a는 20분 동안의 혈액 손실을, 도 13b는 생존율을 나타낸다. 도 13c는 손상 후 1^차 10분(상부 패널) 및 2^차 10분(하부 패널)으로 나누어진 혈액 손실을 나타낸다. APC를 주사한 13마리 마우스 중 4마리는 손상후 1^차 10분 동안 사망했다(오픈 원). 3마리 추가 마우스가 각각 2^차 10분 동안 사망했고(오픈 직사각형), 따라서 하부 패널로부터 제외되었다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. *는 통계적 유의성(모든 p -값 ≤ 0.01)을 나타낸다.

[0207] 실시예 12

[0208] 이 실시예는 결과가 도 14a 및 b에 함유된 실험에 관한 것이다. 실험은 rhAPC 혈장에 의한 트롬빈 생성 억제 및 용량 반응을 나타낸다. 실험에서 트롬빈 생성은 증가하는 rhAPC의 존재하에 14a) 정상 인간 혈장 및 14b) 마우스 혈장에서 측정되었다. 트롬빈 생성은 곡선하 면적 AUC로서 나타냈다.

[0209] 실시예 13

[0210] 이 실시예는 결과가 도 15a 및 b에 함유된 실험에 관한 것이다. A 실험은 rhAPC에 의한 혈장 중 aPTT 응고 시간

의 연장 및 용량 반응을 나타낸다. 이 실험에서 APTT는 증가하는 농도의 rhAPC(n=2-5)로 보충 후 15a) 정상인 간 혈장 및 15b) 묽린 혈장에서 측정하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

[0211] 실시예 14

[0212] 이 실시예는 인간 혈장에서 트롬빈 생성의 APC-유도 감소의 구조를 입증하는, 결과가 도 16a 및 16b에 함유된 실험에 관한 것이다. 실험에서, 트롬빈 생성은 rhAPC의 존재하에 A) 곡선하 면적(AUC) 및 B) 피크 높이로서 정상 인간혈장에서 측정되었다. 트롬빈 생성의 구조를 위해, ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa를 단독으로 또는 조합하여 적용했다.

[0213] 본원에 함유된 결과는 증가하는 농도로 포함된 rhFVIIa 단독은 트롬빈 생성에 대해 어떤 효과도 갖지 않는 반면, ^{수퍼}FVa는 트롬빈 생성을 정상 인간 혈장의 것의 수준으로 보정했다는 것을 나타낸다. 또한, 실험은, ^{수퍼}FVa에 미량의 rhFVIIa(100ng/mL)의 첨가는 트롬빈 생성을 정상 인간 혈장의 약 50% 이상까지 증가시켰다는 것을 나타낸다.

[0214] 이 실험은 rhFVIIa와 수퍼FVa의 조합이 인간 혈장에서 APC에 의해 억제되었던 트롬빈 생성을 상승적으로 증가시켰다는 설득력 있는 증거를 제공한다. 트롬빈 생성을 정상으로 보정하기 위해 rhFVIIa와 조합된 ^{수퍼}FVa의 최저 최적 농도 범위는 수행되지는 않았지만 이러한 결과에 기초하여 측정될 수 있다.

[0215] 실시예 15

[0216] 이 실시예는 결과가 도 17 내지 19 및 28에 함유된 실험에 관한 것이다.

[0217] 도 17에 함유된 실험은 정상 인간 혈장에 대한 항-FVIII 항체의 효과를 연구하기 위해 실행된 혈전 용해 검정 결과를 나타낸다. 항-FVIII 항체의 적정은 5 µg/ml 이상의 항체가 혈전 용해 시간을 CPI 대조군의 수준으로 감소시키기에 충분했음을 나타냈다.

[0218] 도 18은 혈전 용해 검정 결과를 함유하고, 여기서 10 µg/ml 항체 농도를 사용하여 FVIII에 대한 억제제를 갖는 정상 인간 혈장의 혈전 용해에 대한 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 효과를 개별적으로 또는 상승작용 방식으로 연구했다. 본원에 제시된 바와 같이, rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa는 개별적으로 각각 고농도의 2 µg/ml 및 약 2 내지 5 µg/ml에서 10 µg/ml의 항-FVIII 항체로 배양된 정상 인간 혈장에서 혈전 용해 시간의 향상을 나타냈다.

[0219] 도 19는 혈전 용해 검정을 함유하고, 여기서 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa는 조합하여 사용되었다. 본원에서 데이터로 나타낸 바와 같이, 혈전 용해 시간은 rhFVIIa의 감소된 농도에서 두 자리 크기까지 정상 혈장 수준으로, ^{수퍼}FVa에서는 한 자릿수 이상 증가시켜 FVIII에 대한 억제제를 포함하는 정상 인간 혈장의 혈전 용해 시간을 보정하는데 있어서 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa 둘 다의 상승 효과를 입증한 것으로 관찰되었다.

[0220] 도 28은 항-FVIII 항체로 스파이킹된 정상 인간 혈장(NHP)에 대한, 단독 및 조합된 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 효과를 연구하기 위해 실행된 혈전 용해 검정 결과를 나타낸다. 혈전 용해 시간은 40nM rhFVIIa(치료 혈장 농도; 도 28a) 또는 3.33nM ^{수퍼}FVa(도 5b)에서 정상으로 반환되는 것으로 관찰되었다. 그러나, 혈전 용해 시간을 정상화하는데 필요한 rhFVIIa의 농도는 미량의 ^{수퍼}FVa (0.37nM)의 존재하에 100배까지(약 0.4nM로) 감소시킬 수 있었다(도 28a/b). 유사한 결과는 실험이 FVIII 결핍 혈장(FVIIIdP)에서 수행되었을 때 수득되었다(데이터는 제시되지 않음).

[0221] 도 31은 혈전 용해 시간을 NHP에서 예상되는 것으로 정상화하는데 필요한 rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa 단독 또는 조합의 농도를 나타낸다. 일반적으로, NHP의 평균 혈전 용해 시간에 도달하는데 필요한 농도는 조합하여 사용될 때 각 인자에 대해 약 10 내지 100배 더 낮았다.

[0222] 결과 및 분석

[0223] 1. FVIII-결핍 혈장에서 트롬빈 생성에 대한 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 효과

[0224] 본 발명자들은 ^{수퍼}FVa가 인간 FVIII-결핍 혈장에서 ETP를 약 2배 증가시킨다는 것을 증명했다(참조: von Drygalski A, 등 JTH 2014; 12:363-372, 이의 개시 내용은 전문이 명백하게 본원에 참조로 인용된다). rhFVIIa

의 존재하에 ^{수퍼}FVa의 잠재적 첨가제 또는 상승 효과를 연구하기 위해, 트롬빈 생성은 단독 또는 rhFVIIa와 조합된 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa에서 FVIII-결핍 혈장에서 평가했다. 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa는 ETP 및 피크 높이를 약 2.5배 증가시켰다. 90 µg/kg 체중의 FVIIa의 정맥내 투여 후 치료 혈장 수준에 대한 예상치(약 2 µg/mL)보다 약 100배 낮은 고정 용량 25ng/mL의 FVIIa의 첨가는 모든 농도의 ^{수퍼}FVa(0.007 내지 5.28 µg/mL)에서 ETP 및 피크 높이의 추가의 약 2.5배 증가를 유도했다. ^{수퍼}FVa의 최고 농도(5.28 µg/mL)에서, FVIIa의 존재하의 피크 높이는 ^{수퍼}FVa 단독으로 달성될 수 있었던 것에 비해 약 5배로 증가되었다(도 1). 추가로, FVIII-결핍 혈장에서 관찰된 트롬빈 생성의 지체 시간은 FVIIa의 존재하에 제거되었다(도 1).

[0225] 이어서, 저용량의 고정된 ^{수퍼}FVa(0.59 µg/mL)의 존재하에 트롬빈 생성에 대한 증가하는 농도의 FVIIa의 잠재적 첨가제 또는 상승 효과의 상호 관계는 FVIII 결핍 혈장에서 트롬빈 생성으로 측정하였다. ETP 및 피크 높이의 약 2배 증가는 ^{수퍼}FVa의 존재하에 rhFVIIa의 각 농도에서 주시되었고, 지체 시간은 제거되었다(도 2).

[0226] 2. FVIII 억제 항체를 갖는 정상 인간 혈장에서 트롬빈 생성에 대한 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 효과

[0227] 정상 인간 혈장에서 FVIII 억제 항체(억제제)의 존재하에 단독 또는 rhFVIIa와 조합된 ^{수퍼}FVa의 응고촉진 효과를 추가로 평가하기 위해, 트롬빈 생성의 최대 억제를 위한 항-FVIII GMA8015의 최적 농도를 먼저 측정하고, 1.25 µg/mL인 것으로 밝혀졌다. (참조: 도 7.) rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa 단독은 모두 트롬빈 생성의 억제를 해결할 수 있었고, ETP 및 피크 높이를 기준과 비교하여 약 1.5 내지 2배 증가시킬 수 있었다. 참고로, rhFVIIa에 의한 효과는 90 µg/kg의 정맥내 투여 후 일반적 치료 혈장 농도의 약 10%인 약 200ng/mL에서 안정화될 것 같았다. 미량의 rhFVIIa(약 1% 일반적 치료 농도에 상응하는 25ng/mL)를 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa와 배합하였을 때, 또는 미량의 ^{수퍼}FVa(0.59 µg/mL; FV의 일반적 혈장 농도 약 10 µg/mL)를 증가하는 농도의 rhFVIIa와 배합하였을 때, ETP 및 피크 높이가 상당히 증가되었다(도 3). 두 조합은 ETP의 추가의 약 1.5 내지 2배 증가 및 피크 높이의 약 2 내지 3배 증가를 산출했다. 동종형 항체를 포함하고 포함하지 않는 정상 인간 혈장에서 트롬빈 생성은 유사하여 항체 형태는 트롬빈 생성을 방해하지 않았다는 것을 나타냈다. (참조: 도 7).

[0228] 3. 선천적 FVIII-결핍 및 억제제를 갖는 환자의 혈장에서 트롬빈 생성에 대한 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 효과.

[0229] ^{수퍼}FVa 및/또는 rhFVIIa의 응고촉진 효과는 또한 선천적 FVIII-결핍 및 억제제를 갖는 환자에서 연구했다. 고역가 억제제를 갖는 환자로부터 3개의 상업적 및 2개의 임상 수집된 혈장 샘플의 ETP(모든 환자의 경우, 상업적 샘플 BU-역가 = 41, 150 및 280; 임상 샘플 BU-역가 = 64)는 두 개의 상이한 농도의 ^{수퍼}FVa, rhFVIIa, 또는 둘다의 조합의 존재하에 기준에서 평가했다. 결과는 정상 인간 혈장의 ETP와 비교했다(도 4). rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa는 모두 5명 환자 샘플에서 ETP 및 피크 높이를 증가시켰다. ETP 및 피크 높이는 2 µg/mL rhFVIIa (rhFVIIa의 대략 예상된 치료 농도) 및 0.59 µg/mL ^{수퍼}FVa로 스파이킹된 혈장 사이에서 필적할 만했고, ETP 및 피크 높이는 rhFVIIa(2 µg/mL) 및 ^{수퍼}FVa (0.59 µg/mL)를 배합했을 때 현저하게 증가되었다. 인자 치환에 대한 개체간 반응에도 불구하고, 조합은 어느 인자 단독과 비교하여 ETP 또는 피크 높이의 약 1.5배 내지 3배 증가를 달성했다. 참고로, 조합에 의한 효과는 rhFVIIa의 농도가 2 µg/mL로부터 100ng/mL로 20배 감소하였을 때 손상되지 않았고, ETP 및 피크 높이는 FVIIa를 100ng/mL에서 유지시키면서 ^{수퍼}FVa의 농도를 1.76 µg/mL로 증가시켰을 때 추가로 증가하는 것으로 나타났다(도 4). 효과는 임상 수집된 샘플에서 가장 현저했고, 여기서 인자 조합으로 ETP는 정상 풀링된 혈장의 ETP에 필적할 만하게 되었다(도 4b).

[0230] ^{수퍼}FVa의 효과는 또한 급성 관절 출혈을 위해 90 µg/kg의 rhFVIIa에 의한 치료 직전 및 치료 후 5분에 선천적 FVIII-결핍 및 고역가 억제제(BU=64)를 갖는 환자 중의 한 명으로부터 임상 수집된 혈장에서 직접 연구했다. rhFVIIa에 의한 환자 치료는 기준에 비해 ETP 및 피크 높이의 약 1.5배 증가를 유도했다. 환자 혈장에 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa의 생체외 첨가는 기준에서 rhFVIIa로 처리한 후 수집된 샘플에서 ETP 및 피크 높이의 추가의 약 3배 증가를 유도했다(도 5). 피크 높이가 아니라 ETP는 1.76 µg/mL ^{수퍼}FVa에서 안정화되었다. 참고로, ETP 및

피크 높이의 값은 이 환자 혈장이 2 µg/mL rhFVIIa 단독으로 또는 ^{수퍼}FVa와 조합하여 스파이킹되었을 때 rhFVIIa의 주입 후 수득된 값에 상응하였다(도 4b). 이는 시험관내 실험의 경우, 2 µg/mL FVIIa의 농도가 주입 후 치료 농도로서 안전하게 제안될 수 있음을 입증한다.

[0231] 4. 인간 및 무린 혈장에서 rhAPC의 존재하에 ETP 및 응고 시간의 보정에 대한 ^{수퍼}FVa의 효과

[0232] 무린 또는 인간 혈장에서 인간 APC에 의해 최대로 억제된 ETP를 재구성하는 ^{수퍼}FVa의 능력을 다루기 위해, 혈장을 APC의 존재하에 ^{수퍼}FVa 또는 FVa로 스파이킹했다. 인간 및 무린 혈장에서 ETP의 최대 억제를 위한 APC의 최적 농도는 용량-반응에 의해 인간 혈장 또는 무린 혈장에서 각각 5nM 또는 100nM인 것으로 측정되었다(도 14). 유일한 ^{수퍼}FVa는 FVa가 효과를 나타내지 않은 농도의 인간 또는 무린 혈장에서 ETP를 약 90 내지 100%로 복원했다(도 8). 응고 시간의 APC-유도 연장을 정상화하는 ^{수퍼}FVa의 능력을 다루기 위해, aPTT 단축에 대한 ^{수퍼}FVa 및 FVa의 효과를 인간 APC의 존재하에 연구했다. 이러한 실험 이전에, 약 100초로 aPTT 연장을 위한 APC의 최적 농도는 인간 또는 무린 혈장에서 각각 10nM 또는 25nM인 것으로 측정되었다(도 15). ^{수퍼}FVa 및 FVa는 모두 용량 의존적으로 aPTT를 정상화했다. 그러나, 인간 혈장에서 ^{수퍼}FVa는 FVa와 비교하여 100배 더 낮은 농도에서 aPTT를 정상화했다(도 9a). 0.05U/mL FVa 변이체에서, ^{수퍼}FVa는 aPTT를 완전히 보정한 반면, FVa는 aPTT를 단지 약 100으로부터 80초로 단축했다(도 9b). 유사한 발견은 무린 혈장에서 증명되었다. 5U/mL FVa 변이체에서, ^{수퍼}FVa는 aPTT를 완전히 보정한 반면, FVa는 aPTT를 단지 약 100로부터 70초로 단축시켰다(도 9c).

[0233] 5. Balb/c 마우스에게 rmAPC의 정맥내 투여 후 응고 시간의 보정에 대한 ^{수퍼}FVa의 효과

[0234] 생체외 전혈 aPTT 검정에서, Balb/c 마우스에게 생리 식염수의 정맥내 주사와 비교하여 rhAPC(0.5mg/kg)의 정맥내 주사는 응고 시간을 생리 식염수에 의한 평균 30초로부터 APC에 의한 평균 67초로 두배화했다(생리 식염수 n=31; rmAPC n=16; p<0.0001). APC 주사 후 즉시 채취된 전혈에 ^{수퍼}FVa의 생체외 첨가는 aPTT를 평균 30초로 정상화한(n=11; p=0.0005) 반면, FVa의 생체외 첨가는 상당한 효과를 나타낼 수 없었다(평균 aPTT 50; n=11; p=0.2). FVa 변이체의 효과는 농도 의존적으로 보였고, ^{수퍼}FVa 및 FVa 사이에 전혈 aPTT 보정의 차이는 FVa 변이체가 저농도로 사용될 때(0.05U/mL; n=8) 가장 현저한 것으로 나타났다. 증가하는 농도의 FVa 변이체로, 차이는 덜 명백하게 되었다(0.5 또는 1U/mL; n=3)(도 10).

[0235] 6. ^{수퍼}FVa에 의해 BALB C 마우스에서 꼬리 클립 후 급성 APC-유도 출혈의 효율적인 예방

[0236] APC로 처리된 Balb/c 마우스에서 출혈 감소를 위한 ^{수퍼}FVa의 생체내 효능을 측정하기 위해, 혈액 손실을 먼저 통상의 꼬리 절단 모델에서 측정했다. 혈액은 초기 출혈을 후기 재출혈과 구별하기 위해 꼬리 클립 후 1차 10분 및 2차 10 내지 20분동안 별도로 수집했다. 현저한 출혈을 유도한 APC의 용량은 생체내 용량 반응에 의해 1.25mg/kg인 것으로 측정되었다. 배합된 20분 출혈 기간 동안, 혈액 손실은 생리 식염수에 의한 평균 3.4 µL/kg 으로부터 APC(p=0.007)에 의한 평균 27 µL/kg로 증가되었다(도 11a). APC-주사 직전 2분에 ^{수퍼}FVa에 의한 보호는 혈액 손실을 용량 의존적으로 감소시켰다. 5U/mL에서, 21 µL/kg로의 평균 혈액 손실의 가벼운 감소가 관찰된 반면, 25U/mL에서 9.2 µL/kg(p=0.04)으로의 평균 혈액 손실의 상당한 감소가 달성되었다(도 11a).

[0237] APC 후 혈액 손실은 꼬리 클립 후 1차 및 2차 10분 동안 연속적이었고 유사했다(각각 평균 13.7 및 13.2 µL/kg). ^{수퍼}FVa는 두 시간 기간 동안 충분히 동일하게 혈액 손실을 감소시켰다. 고용량의 ^{수퍼}FVa(25U/mL)는 혈액 손실을 1차 및 2차 10분 동안 각각 평균 4.3 µL/kg 및 4.8 µL/kg로 상당히 억제했다(모든 p-값 ≤ 0.05)(도 11b/c).

[0238] 7. 미세혈관 실질 기관 출혈을 연구하기 위한 중요한 종점으로서 마우스에서 간 열상의 가능성

[0239] 간 열상은 급성 외상성 기관 손상 후 미세 혈관 매개된 실질 다량 출혈에 관한 중요한 정보를 제공하기 때문에, 랫트, 래빗 및 돼지 (8-10)와 같은 대형 동물에서 종종 출혈 모델로서 사용된다. 대조적으로, 꼬리 클립 후 출혈은 큰 동맥과 정맥 혈관의 완전 절개 후 출혈 패턴을 더 모방한다. 두 모델의 출혈 패턴은 상이할 수 있고, 상보적 정보를 제공할 수 있다. 그러나, 마우스 간 열상은 드물게 수행되고, 작은 동물에서 수술적 개입 및 복부 혈액 수집에 속하는 기술적인 과제에 기인하여 보편적으로 확립되지 않았다. 본 발명자들은 바자지 등(Bajaj

등)(11)으로부터 변형된 수술적 접근법을 확립했고, 이에 의해 간은 복부 중선 절개 후 표면화하고, 좌측 간 엽은 10mm 길이 메스 절단으로 찢은 다음 생리 식염수(37°)로 쉬운 위치에서 마우스로 혈액 수집했다.

[0240] 모델의 가능성 및 타당성은 꼬리 클립 후 결과와 간 열상 후 결과를 비교하여 꼬리 클립 모델에서 확립된 출혈 소인을 갖는 혈우병 마우스에서 실행했다 두 모델에서, 20분 후 평균 혈액 손실은 유사했다(간 열상 40 μ L/g; 꼬리 클립 35.7 μ L/g). 그러나, 평균 표준 오차(SEM), 표준 편차(SD) 및 개체간 혈액 손실 범위는 꼬리 클립 모델과 비교하여 간 열상 모델에서 각각 약 4배 감소되었다(도 12). SEM, SD 및 범위는 각각 5에서 1.7로, 20에서 4.9로, 61.1에서 14.6 μ L/g으로 감소되었다. rhFVIII(50U/kg)로 처리될 때, 야생형 Balb/c 마우스에서 혈액 손실에 필적하는 상당한 혈액감소가 모델에서 달성되었다. FVIII-처리된 혈우병 마우스 및 생리 식염수 처리된 야생형 Balb/c 마우스에서 평균 혈액 손실은 25 μ L/g 및 29 μ L/g (대 간 열상 모델에서 40 μ L/g 미처리 혈우병 마우스; $p < 0.0001$), 꼬리 클립 모델에서 9.7 μ L/g 및 4.2 μ L/g (대 각각 35.7 μ L/g 미처리 혈우병 마우스; $p = 0.002$)이 었다. 혈액 손실의 낮은 개체간 차이는 간 열상 모델에서 통계적 유의성을 획득하기 위해 필요한 동물수를 현저하게 감소시킨다(간 열상 26마리 마우스; 꼬리 클립 39마리 마우스)(도 12). 이러한 결과를 감안하여, 본 발명자들은 마우스의 간 열상이 마우스의 지혈을 연구하기 위한 타당한 대체 방법이라고 결정했다.

[0241] 8. ^{수퍼}FVa에 의한 Balb C 마우스에서 간 열상 후 급성 APC-유도 출혈의 효율적인 치료

[0242] 간 열상 모델에서 APC로 처리된 야생형 Balb/c 마우스에서 출혈 감소를 위한 ^{수퍼}FVa의 생체내 효능을 측정하기 위해, 마우스는 ^{수퍼}FVa(25U/mL) 또는 생리 식염수를 정맥내 주사한 다음, 정맥내 APC(1.25mg/kg)가 따른다. APC 및 ^{수퍼}FVa의 투여는 꼬리 출혈 모델에서 최적의 결과를 산출하는 조건에 기초했다(도 11). 꼬리 클립 후와 같이, 간 열상 후 20분 동안 평균 혈액 손실은 생리 식염수(29.5 μ L/g; $p = 0.007$)를주사한 마우스와 비교하여 APC(40 μ L/g)를 주사한 마우스에서 상당히 더 높았고, ^{수퍼}FVa에 의한 치료는 평균 혈액 손실을 기준 값(29 μ L/g; $p = 0.02$)으로 상당히 감소시켰다(도 13a). 간 열상 후 1차 10분 동안 평균 혈액 손실은 APC-주사 후(35.1 μ L/g 대 생리 식염수 22.5 μ L/g; $p < 0.0001$) 현저했고, 꼬리 클립 후보다 상당히 더 높았다(35.1 μ L/g 대 13.7 μ L/g; $p < 0.0001$). 꼬리 클립 모델과 대조적으로, 단지 약간 더 많은 출혈이 따라서 2차 10분 동안 관찰되었다. 1차 10분 동안 APC에 의한 과도한 출혈은 54% 사망률과 관련되었다. ^{수퍼}FVa에 의한 치료는 1차 10분 동안 1차 10분 동안 평균 혈액 손실(35.1 μ L/g 내지 23.2 μ L/g ($p = 0.001$))을 대조군 야생형 마우스에서 기준에서 관찰된 혈액 손실(22.5 μ L/g)에 등가로부터 보정할 뿐만 아니라 출혈 유도 치사성을 없앴다(도 11).

[0243] 9. 인간 혈장에서 트롬빈 생성의 APC-유도 감소의 구조.

[0244] 도 16의 실험은 rhFVIIa 단독은 증가하는 농도로 트롬빈 생성에 대해 효과를 갖지 않은 반면, ^{수퍼}FVa는 트롬빈 생성을 정상 인간 혈장의 것의 수준으로 보정했다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 미량의 rhFVIIa(100ng/mL)를 ^{수퍼}FVa에 첨가하면 트롬빈 생성을 정상 인간 혈장의 약 50% 이상으로 증가시켰다.

[0245] 이러한 실험은 rhFVIIa와 ^{수퍼}FVa의 조합이 인간 혈장에서 APC에 의해 억제된 트롬빈 생성을 상승적으로 증가시켰다는 설득력 있는 증거를 제공한다. 용량 조사 연구는 트롬빈 생성을 정상 수준으로 보정하기 위한 rhFVIIa와 조합된 ^{수퍼}FVa의 최저 최적 농도 범위를 측정하기 위해 수행할 수 있다.

[0246] 10. 혈전 용해 검정 결과

[0247] 혈전 용해 검정은 정상 인간 혈장에 대한 항-FVIII 항체의 효과를 연구하기 위해 먼저 수행했다(도 17). 항-FVIII 항체의 적정은 5 μ g/ml 이상의 항체가 혈전 용해 시간을 CPI 대조군의 수준으로 감소시키기에 충분했음을 나타냈다. 10 μ g/ml 항체 농도를 FVIII에 대한 억제제를 갖는 정상 인간 혈장의 혈전 용해에 대해 개별적으로 및 상승작용 방식으로 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 효과를 연구하는데 추가로 사용했다.

[0248] rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa는 개별적으로 각각 고농도의 2 μ g/ml 및 약 2 내지 5 μ g/ml에서 10 μ g/ml의 항-FVIII 항체로 배양된 정상 인간 혈장에서 혈전 용해 시간의 향상을 나타냈다(도 18). 그러나, 그들 둘 다를 함께 사용하면, 혈전 용해 시간은 rhFVIIa의 감소된 농도에서 두 자리 크기로, ^{수퍼}FVa에서 한 자릿수 크기로 정상 혈장 수준으로 향상시키는 것으로 관찰되었다(도 19). 결과는 명백하게 FVIII에 대한 억제제를 갖는 정상 인간 혈장의 혈전 용해 시간을 보정하는데 대한 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa 둘 다의 상승 효과를 시사한다. 도 18에서 CPI, 억제제 및

rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa를 갖는 혈장 샘플을 음성 대조군으로서 사용하여 혈전 용해 시간의 향상은 사실 이러한 인자 중의 하나에 기인하고 응고 캐스케이드의 임의의 다른 성분 때문이 아니라는 것을 나타냈다.

[0249] 더욱이, 또한 FVIII에 대한 억제제를 갖는 정상 인간 혈장의 혈전 용해 시간을 보정하는데 있어서, 단독으로 또는 조합하여 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa는 FVIIIIdP에서 혈전 용해 시간을 보정하기 위해 상승적으로 작용하는 것으로 나타났다(도 28).

[0250] 11. FVIII-억제 항체를 갖는 FVIIIIdP 및 NHP에서 혈전 용해에 대한 ^{수퍼}FVa 및 FVIIa의 효과.

[0251] 응고 안정성은 10 µg/mL 항-FVIII 항체(GMA8015)를 갖는 NHP에서 뿐만 아니라 FVIIIIdP에서 t-PA 유도 혈전 용해 시간으로서 연구했다. 항체의 농도는 항체 적정 후(데이터는 제시되지 않음) 약 105분으로부터 75분으로 혈전 용해 시간의 최대 단축에 기초했다. 항체(10 µg/mL)의 존재하에 혈전 용해 시간은 트롬빈 활성화가능한 섬유소 용해 억제제(TAFI) 활성화의 억제를 유도하기 때문에 대조군으로서 사용된 CPI의 존재하의 혈전 용해 시간과 유사했다. NHP 및 FVIIIIdP는 개별적 또는 조합된 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa로 보충했다. 항-FVIII-항체를 갖는 NHP에서, 증가하는 농도의 rhFVIIa 또는 ^{수퍼}FVa는 혈전 용해 시간의 증가하는 연장을 입증했다(도 5). 혈전 용해 시간은 40nM rhFVIIa(치료 혈장 농도; 도 28a) 또는 3.33nM ^{수퍼}FVa에서 정상으로 반환되었다(도 5b). 혈전 용해 시간을 정상화하기 위한 rhFVIIa의 농도는 미량의 ^{수퍼}FVa(0.37nM)의 존재하에 100배 내지 약 0.4nM로 저하시킬 수 있었다(도 28a 및 28b). 실험을 FVIIIIdP에서 수행한 경우 유사한 결과가 획득되었다(데이터는 도시되지 않음).

[0252] 실시예 16

[0253] 다음 재료 및 방법을 이 실시예에 사용했다.

[0254] 재료

[0255] 정상 폴링된 인간 혈장(NHP)은 조지 바이오-메디칼(Overland Park, KS, USA)로부터 구입했다. 다음 시약이 사용되었다: 리바룩사반(Xarelto®, 바이엘 헬스케어, 레버쿠젠, 독일), 아픽사반(Eliquis®, 브리스톨 메이어스-스퀴브, 미국 뉴저지주 프린스턴), 4-인자 PCC(KcentraTM; CSL-베링, 미국 펜실베이니아주 킹 오브 프리시아), 재조합 인간 조직 인자(TF)(Dade Innovin®, 데이드 베링; 미국 델라웨어주 뉴워크), 옥수수 트립신 억제제((CTI) 및 트롬빈(둘 다 엔자임 리서치 라보라토리즈, 미국 인디애나주 사우스 벤드), 트롬빈 보정이기(다이아그노스틱 카 스타고, 미국 뉴저지주 파시파니), 기질 Z-Gly-Gly-Arg-AMC(백캡, 스위스 부벤도르프), 재조합 인간 FVIIa(NovoSeven®, 노보노르디스크, 덴마크 박스베어드). 인지질 소포(80% 포스파티딜콜린(PC), 20% 포스파티딜세린(PS))는 아반티 리피즈(앨러배스터, 미국 앨라바마주)로부터 구입했고, 기재된 바와 같이[18] 제조했다.

[0256] 단백질 제조

[0257] 재조합 ^{수퍼}FV (M.wt. 174kDa)는 B-도메인 결실된 S2183A FV 플랫폼 상에서 제조하고, 기재된 바와 같이[19]. 항-FV 3B1 및 HV5101 모노클로날 항체를 사용하여 친화도 크로마토그래피의 조합에 의해 안정한 형질감염된 BHK 세포의 조정 배지로부터 정제했다. ^{수퍼}FV 단백질 농도는 제조업자 지침에 따라서 FV ε 1%= 16.9(DNASTAR (레이저진, 위스콘신주 매디슨) 및 ELISA(엔자임 리서치 라보라토리즈, 미국 인디애나주 사우스 벤드)를 사용하여 아미노산 조성 및 MW 174kDa에 기초하여 계산됨)를 사용하여 280nm에서 흡광도로 측정했다. ^{수퍼}FV 단백질은 프로트롬비나제 완충제(50mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% BSA, 5mM CaCl2 및 0.1mM MnCl2)에서 37 °C에서 20분 동안 2nM 트롬빈으로 활성화했다. 활성화는 1.1 몰 당량의 히루딘의 첨가로 종결시켰다.

[0258] 트롬빈 생성 검정

[0259] 트롬빈 생성 또는 내생적 트롬빈 잠재력(ETP) 검정은 기재된 바와 같이[20] 실행했다. 간단하게, CTI, TF, PCPS로 보충된 혈장 샘플은 리바룩사반, 아픽사반, Kcentra®, NovoSeven® 또는 ^{수퍼}FVa의 존재 또는 부재하에 37 °C 소포에서 혈장으로 예비배양했다. 트롬빈 생성은 HBS/0.5 % BSA 중의 CaCl2 및 Z-Gly-Gly-Arg-AMC의 첨가로 개시했다. 최종 반응 혼합물은 총 용적 100 µl로 50% 혈장, 0.725 µM CTI, 0.2Pm TF, 4 µM PCPS 소포, 0.5mM Z-GGR-AMC, 7.6mM CaCl2를 함유했다. 리바룩사반, 아픽사반, Kcentra®, NovoSeven® 또는 ^{수퍼}FVa의 농도는 결과 섹션 및 도면 범례에 지시된다. 형광은 제미니 EM 형광 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여

여 360/460nm의 여기/발광 파장에서 측정했다. 형광 시간 경과 데이터는 기재된 바와 같이[21] Nm 트롬빈으로 전환시켰다. 곡선하 면적(AUC)으로서 정의된 ETP 및 피크 높이는 오리진 소프트웨어를 사용하여 측정했다.

[0260] **결과**

[0261] NOAC 리바룩사반 및 아픽사반의 존재하에 NHP에서 트롬빈 생성에 대한 ^{수퍼}FVa 및FVIIa의 효과.

[0262] 리바룩사반 또는 아픽사반을 NHP에 첨가했을 때, ETP의 최적의 억제제가 두 제제에 대해 용량 적정 후 200nM의 농도에서 도달했다(도 20 및 21). 이 농도는 경구 투여 후 인간에서 달성된 피크 혈장 농도에 근접한다[22, 23]. 억제제(90 μg/kg)를 갖는 혈우병 환자에게 최대 승인된 용량에서 인간에게 정맥내 투여 후 예상된 피크 혈장 농도에 상응하는 rhFVIIa 2 μg/ml도 최대 농도(400nM)의 ^{수퍼}rFVa도 리바룩사반 또는 아픽사반 중의 어느 하나(200nM)로 억제된 NHP의 ETP를 향상시킬 수 없었다(도 20 및 21). 그러나, 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재하에 rhFVIIa(2 μg/mL)을 증가하는 농도의 ^{수퍼}FVa (6.25 내지 400nM)와 조합하면 기준에 비해 ETP를 약 2배, 피크 높이를 약 1.5배 향상시켰다. 최대 안정기 효과는 25 내지 50nM의 ^{수퍼}FVa에서 도달되었고, 더 높은 농도의 ^{수퍼}FVa로에 의한 ETP 또는 피크 높이의 추가의 증가는 없었다. (도 20 및 21).

[0263] NOAC 리바룩사반 및 아픽사반의 존재하에 NHP에서 트롬빈 생성에 대한 ^{수퍼}FVa 및Kcentra™의 효과.

[0264] 4-인자 PCC Kcentra™는 와파린 유도 출혈의 역전을 위해 승인되고 효과적이고[9], 또한 종종 NOAC-유도 출혈 부재 임상적 유효성 증거를 위해 오프-라벨 사용된다. 따라서, 본 발명자들은 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재하에 NHP에서 트롬빈 생성 검정을 사용하여 Kcentra™ 단독 및 ^{수퍼}FVa와의 조합 효과를 연구했다. Kcentra™를 최고 권장 용량(50U/kg)의 정맥내 주입 후 예상된 혈장 농도(1.35U/Ml)에 근접하는 농도로 NHP에 첨가할 때, Kcentra™ 단독은 리바룩사반 또는 아픽사반 중의 어느 하나(20nM)로 억제된 트롬빈 생성을 증가시킬 수 없었다(도 22 및 23). 그러나, ETP 및 피크 높이에 대한 상승 효과는 Kcentra™를 ^{수퍼}FVa와 조합했을 때 관찰되었다. ^{수퍼}FVa의 고정 농도(50Nm)에서, 리바룩사반 또는 아픽사반(200nM)의 존재하에 증가하는 농도의 Kcentra™(0.08 내지 1.35U/Ml)은 기준에 비해 ETP를 최대 약 4배, 피크 높이를 최대 약 2배 증가시켰다(도 22 및 23). 유사하게, 고정 농도의 Kcentra™(1.35U/ml)에서, NHP에서 ^{수퍼}FVa(1.25 내지 400Nm)의 적정은 리바룩사반 또는 아픽사반(200nM)의 존재하에 ETP 및 피크 높이 둘 다를 기준에 비해 최대 약 4배 향상시켰다(도 24).

[0265] 실시예 17

[0266] 다음 재료 및 방법을 이 실시예에 사용했다.

[0267] **동물.**

[0268] 스크립스 연구소의 기관 동물 및 관리위원회가 승인한 바와 같이 모든 기재 동물 프로토콜을 수행했다. 여러 번 식 쌍의 FVIII-결손 마우스(Balb/c 배경)는 박사의 관대한 선물이었다 데이비드 릴리크랩. ≥ 8주령 두 성별의 마우스를 꼬리 출혈 검정에 사용했다.

[0269] **FVIII-결핍 마우스의 출혈 검정.**

[0270] 마우스를 마취시키고, 온도 조절된 가열 패드(37 °C)에 배치하고, 꼬리를 소정 용적의 37 °C 생리 식염수(0.9% NaCl)에 20분 동안 침지시킨 후 꼬리 말단부를 1.5mm 직경으로 절단했다. 혈액 손실은 2% 아세트산에 의한 적혈구 용해 후 생리 식염수 용액 중 헤모글로빈 농도로 결정하고, 405nm에서 흡광도로 측정했다. 규정된 혈액 용적으로부터 유도된 헤모글로빈 표준을 사용하여, 혈액 손실은 46% 적혈구 용적을 가정하여 계산하고 μL/g 체중으로 나타냈다. FVIII-결핍 마우스 그룹은 꼬리 절단 직전 2분 이내에 동일 용적(200 μM)의 주사용 멸균 생리 식염수(0.9%, Hospira Inc.), rhFVIII 200단위/kg FVIII(Xyntha®, 화이자, 미국 뉴욕주 NY) ^{수퍼}FVa, rhFVIIa(NovoSeven®, 노보노르디스크, 덴마크 박스베어드) 또는 ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa의 조합을 (역-궤도) 정맥내 주사했다. 모든 제제는 주사용 멸균 염화나트륨 0.9%(호스피라 인코포레이티드)로 희석했다. FVIII에 의한 경우와 같이, FVa 변이체 투여는 프로트롬비나제 보조 인자 활성화에 기초했고, 이에 의해 20nM 야생형 FVa의 활성화(대략적인 FV 혈장 농도)은 1단위로서 정의했다.

[0271] **통계 분석.**

- [0272] 스튜던츠 t-테스트 또는 출혈의 경우, 두 개의 꼬리 맨-히튀니 테스트가 따르는 크로스칼-윌리스를 적절한 경우 통계적 유의성을 평가하기 위해 사용했다. ≤ 0.05 의 p-값은 통계적으로 유의하다고 간주했다.
- [0273] **결과**
- [0274] ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa를 조합하여 FVIII-결핍 마우스에서 급성 꼬리 출혈의 효율적인 치료.
- [0275] 혈우병에서 출혈 감소를 위한 ^{수퍼}FVa 단독 또는 rhFVIIa와 조합된 생체내 효능을 측정하기 위해, 20분 출혈 기간 동안 혈액 손실은 FVIII-결핍 마우스에서 꼬리 절단 모델에서 측정했다. ^{수퍼}FVa는 용량 의존 방식으로 혈액 손실을 상당히 감소시켰다. 최저 용량의 ^{수퍼}FVa (10 U/kg)를 주사한 마우스에서 평균 혈액 손실은 생리 식염수와 유사했지만(25.9 μ L/g 대 26.3 μ L/g), 고용량의 주사로 상당히 향상되었다. 평균 혈액 손실은 40 및 200U/kg의 ^{수퍼}FVa($p=0.005$)에서 9.7 및 2.5 μ L/g로 감소되었다. 최고 용량의 ^{수퍼}FVa (200u/kg)로 달성된 혈액 손실 감소는 rhFVIII (2.9 μ L/g)와 구별할 수 없었다. 이미 보고된 바와 같이, FVIII-결핍 마우스에서 rhFVIIa에 의한 출혈 감소는 혈우병 환자에게 사용된 것보다 10 내지 100배 더 높은 용량에서 단지 달성될 수 있었다(21). 생리 식염수(25.9 μ L/g)와 비교하여, 1mg/kg rhFVIIa(인간에서보다 약 10배 더 높은 용량) 및 3mg/kg rhFVIIa의 주사 후 평균 혈액 손실은 16.8 μ L/g($p=0.1$) 및 7.2 μ L/g($p=0.003$)로 감소되었고, 이는 rhFVIII(2.9 μ L/g, $p=0.03$)와 상당히 상이하게 잔류했다. 저 용량의 rhFVIIa(1mg/kg)를 이전에 혈액의 감소를 입증하지 않았던 ^{수퍼}FVa 10U/kg 농도와 조합할 때, 16.7 μ L/g로부터 10.2 μ L/g으로의 평균 혈액 손실의 상당한 감소가 주시되었다($p=0.05$). rhFVIIa 3mg/kg을 중간 용량의 ^{수퍼}FVa(40U/kg)와 조합했을 때, rhFVIII에 의해 관찰된 것과 유사하게 출혈이 제거되었다. 평균 혈액 손실은 rhFVIIa 단독에 의한 7.2 μ L/g으로부터 두 분자가 조합한 경우 1.6 μ L/g($p=0.01$)로 감소되었다 조합하여, 이러한 결과는 FVIII-결핍 마우스에서 출혈 감소에 대한 rhFVIIa 및 ^{수퍼}FVa의 상승 효과를 시사한다(도 25a 내지 c).
- [0276] ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa를 조합하여 FVIII-결핍 마우스에서 급성 꼬리 출혈의 효율적인 치료.
- [0277] FVIII에 대한 억제제의 존재하에 단독 또는 rhFVIIa와 조합으로 출혈을 감소시키는 ^{수퍼}FVa의 효능을 추가로 설명하기 위해, 20분 출혈 기간 동안 혈액 손실은 항-FVIII 항체(0.25 mg/kg)로 처리된 Balb/c 마우스의 꼬리 절단 모델에서 측정했다. 마우스 중 항체의 베타스다 단위는 35 ± 2 BU/ml인 것으로 추산되었다. FVIII-결핍 마우스 모델에서 본 이전 연구와 일치하는 상당한 용량 의존적 출혈 감소가 ^{수퍼}FVa로 관찰되었다. 저용량의 ^{수퍼}FVa(10U/kg)가 대조군 생리 식염수 주사된 마우스보다 상당한 출혈 감소를 나타내지 않지만(19.47 μ L/g 대 30.9 μ L/g 각각), 고용량의 ^{수퍼}FVa(40U/kg)는 생리 식염수와 비교하여 출혈을 상당히 감소시켰다(9.97 μ L/g, $p = 0.005$). 유사하게, 저용량의 rhFVIIa(1mg/kg)는 출혈(22.18 μ L/g)을 상당히 감소시킬 수 없었지만, 고용량 3 mg/kg rhFVIIa는 출혈(7.13 μ L/g, $p= 0.0005$)을 상당히 감소시켰다. 저용량의 ^{수퍼}FVa(10U/kg) 및 rhFVIIa(1mg/kg)를 함께 조합하면 출혈을 유의한 방식으로 10.77 μ L/g, $p = 0.003$ 로 상승적으로 감소시켰다(도 29). 본 발명자들은 항-FVIII 항체로 처리된 Balb/c 마우스의 출혈 감소에서 효과를 시험하기 위해 본 실험실에서 정제된 mFVIIa를 사용했다. 저농도의 mFVIIa(20 μ g/kg)에서, 출혈 감소는 생리 식염수 주사 마우스와 상당히(27.2 μ L/g) 상이하지 않았다. 그러나, 90 μ g/kg(인간에서 rhFVIIa의 치료 용량과 유사한 투여량)에서 상당한 출혈 감소가 관찰되었다(8.77 μ L/g, $p=0.0009$). 본 발명자가 저용량의 ^{수퍼}FVa(10U/kg)와 mFVIIa(20 μ g/kg)를 조합했을 때, 혈액 손실은 생리 식염수 조사 마우스와 비교하여 16.15 μ L/g($p= 0.0141$)로 상당히 감소되었다(도 29a/b).
- [0278] 연구는 또한 항-FVIII 항체로 처리된 Balb/c 마우스에서 rhFVIIa 및 mFVIIa에 의해 출혈을 감소시키는데 필요한 투여량을 직접 비교하는데 도움이 되었고(도 30), 이는 FVIII에 대한 억제제를 갖는 환자의 출혈 합병증을 치료하는데 있어서 ^{수퍼}FVa 및 rhFVIIa의 상승적 연합 개념의 증거를 제공했다.
- [0279] **결론**
- [0280] 증가된 출혈 위험은 다양한 항응고 약물을 사용하는 치료를 받고 있는 환자에서 관찰되고, 출혈위험을 감소시키는 프로-지혈제에 대한 충족되지 않은 필요성이 존재한다. 일부 임상 시험에서, 야생형(wt) APC 요법은 심각한 출혈의 증가된 위험과 관련되었다. 염증성 손상 및 APC가 유리했던 질환의 대부분 동물 모델에서, APC의 세포

보호 효과는 APC 요법의 보호 효과에 대한 책임이 있었던 반면, 이의 항응고제 효과는 필요하지도 기여하지도 않았다. 따라서, wt APC의 항응고 활성 및 출혈 관련 위험은 잠재적인 신규 wt-APC 요법의 제한 인자일 수 있다. wt APC의 세포 보호 활성에 영향을 주지 않는 wt APC-항응고제 특이적 해독제 또는 역전제의 이용 가능성이 매우 바람직할 것이다.

[0281] 본 발명자들은 혈우병에서 지혈을 강력하게 정상화하는 유전자조작된 FVa-변이체인 ^{수퍼}FVa가 wt APC-유도된 출혈을 감소시킬 수 있었던 프로-지혈 생물학을 위한 기준을 충족시킨다고 가설을 세우고, 여기서 본 발명자들은 이 가설을 시험한다. ^{수퍼}FVa는 A2 및 A3 도메인(FV(A2-SS-A3)) 사이의 유전자조작된 이황화 결합(Cys609-Cys1691)에 기인하여 wt FVa와 비교하여 향상된 특이적 활성을 갖고, 이의 생물학적 활성은 APC 절단 부위(Arg506/306/679Gln)의 돌연변이 및 글리코실화를 변경하는 돌연변이(Ser2183Ala)에 의해 강화된다. 이러한 변경의 결과로, ^{수퍼}FVa는 wt APC에 내성인 것으로 밝혀졌고, 지혈 특성을 정상화하고, 혈우병 마우스 모델에서 wt FVa보다 훨씬 더 효율적으로 출혈을 예방했다.

[0282] aPTT 응고 검정에서, ^{수퍼}FVa 및 wt FVa는 모두 wt-APC가 응고를 연장하기 위해(aPTT > 100초) 사용되었을 때 용량 의존적으로 응고 시간을 정상화했다. 그러나, ^{수퍼}FVa는 wt FVa와 비교하여 100배 더 낮은 농도에서 aPTT를 정상화했다. 인간 또는 무린 혈장을 사용하는 트롬빈 생성 검정에서, ^{수퍼}FVa는 wt FVa가 효과를 나타내지 않은 농도에서 트롬빈 생성을 완전히 복원했다.

[0283] 생체외 전혈 aPTT 검정에서, Balb/c 마우스에서 무린 재조합 wt APC(0.5mg/kg)의 정맥내(iv) 주사는 응고 시간을 30초에서 약 60초(n=40)로 두배로 했다. 전혈에 ^{수퍼}FVa(1nM)의 첨가는 aPTT 응고 시간을 상당히 정상화하는 반면, wt FVa는 상당한 효과를 나타내지 못했다.

[0284] Balb/c 마우스의 꼬리 클립-출혈 모델에서, 인간 재조합 또는 혈장 유도된 wt APC의 주사(iv)는 1.25mg/kg에서 상당한 출혈을 유도했고, 평균 혈액 손실은 생리 식염수에 의한 3.4 µL/g으로부터 wt APC 처리에 의한 27 µL/g으로 증가되었다. wt APC 투여 2분 전에 주사된(iv 3.5mg/kg) ^{수퍼}FVa는 출혈을 9.2 µL/g(n 약 10/그룹)으로 상당히 감소시켰다.

[0285] 다른 출혈 모델에서, 간 열상은 급성 장기 손상 후 미세혈관 매개 출혈에 관한 중요한 정보를 제공하기 때문에 사용되었다. 혈우병 대 대조군 마우스에서 마우스 해부학 및 검증을 위한 랫트 및 래빗에 사용된 모델의 적응 및 기술적 수정 후, 이 모델은 꼬리 클립 출혈 모델과 비교하여 약 4배 감소된 개체간 혈액 손실 범위로 출혈의 신뢰 가능한 평가를 제공한다. 인간 wt APC의 주사(iv)는 혈액 손실을 29 µL/g으로부터 49 µL/g으로 증가시키고, 과도한 출혈은 약 40% 사망률과 관련되었다. ^{수퍼}FVa는 20분 후 wt APC-유도 출혈을 29 µL/g으로 상당히 감소시키고, 출혈 유도 사망률을 제거했다.

[0286] 현저하게, 꼬리 클립 및 간 열상 모델에서 출혈 패턴은 혈액 손실이 손상 후 1^차 및 2^차 10분 동안 별도로 측정되었을 때 상이했다. 꼬리 클립 모델에서, 꼬리 클립 후 모든 1^차 및 2^차 10분 동안 wt-APC 유도 출혈 및 ^{수퍼}FVa는 두 단계 동안 혈액 손실을 감소시켰다. 간 열상 모델에서, 대부분 혈액 손실은 손상 직후에 발생했고, 2^차 10분 동안 출혈은 덜 현저했다. 그러나, 이 모델에서, ^{수퍼}FVa는 혈액 손실을 1^차 10분 단계 동안 완전히 보정하고, 2^차 10분 단계 동안 출혈을 완전히 방지했다.

[0287] 따라서, 본 결과는 FVa, 특히 ^{수퍼}FVa가 APC-관련 출혈을 억제하거나 예방하기 위해 사용될 수 있음을 입증한다. 이와 관련하여, 심각한 출혈은 일반적으로 항응고 요법의 빈번한 합병증이고(32), APC-요법으로 보고되었으며(21), 방사선 손상의 완화와 같은 중요한 징후에 대한 야생형 APC의 임상 개발을 복잡하게 할 수 있다(33). 여기서, 본 발명자들은 유전자 조작된 FVa 변이체인 ^{수퍼}FVa가 야생형 APC에 의한 출혈의 효율적인 프로지혈 역전제임을 입증한다.

[0288] 본원에 기재된 바와 같이, APC 유도 출혈의 출혈 역전제로서 ^{수퍼}FVa의 효과를 연구하기 위해, 본 발명자들은 단 일 정맥내 투여 후 마우스에서 출혈을 유도하는 APC의 최적 용량이 용량 반응에 의해 1.25mg/kg임을 확립했다. 꼬리 클립 후 개체간 출혈 변화를 가능한 한 최대 극복하기 위한 필요성을 감안하여, 최적 APC 용량을 꼬리

클립 모델에서 확립한 다음, 간 열상에 적용했다. 두 출혈 모델에서, ^{수퍼}FVa는 혈액 손실을 APC로 처리된 마우스에서 상당히 감소시켰다. 1^차 10분 이내에 대량의 혈액 손실은 약 50% 사망률과 관련되었다. 특히, ^{수퍼}FVa는 APC 처리하지 않은 마우스에서의 혈액 손실과 유사한 상당한 출혈 보호를 제공할 뿐만 아니라 출혈 유도 사망률을 제거했다.

[0289] ^{수퍼}FVa가 APC-유도 출혈을 방지하는 메커니즘은 프로트롬비나제 복합체 내의 FVa 활성화 증가와 일치한다. 프로트롬비나제 복합체에 FVa의 존재는 트롬빈 생성 속도를 약 10,000배로 강력하게 향상시킨다는 것이 충분히 기재되어 있다(36, 37). 그러나, FVa는 또한 Arg506에서 단백질 분해 절단에 이어 Arg306에서 느린 절단을 통해 APC에 의해 급속히 불활성화된다. 이러한 불활성화 절단 부위, 예를 들면, Arg506Gln (a.k.a. 의 돌연변이 FV_{라이덴})는 FVa 보조 인자 활성화 반감기를 연장한다. FVa APC-불활성화가 내성이도록 하는 FVa 및 특히 돌연변이가 임상 출혈을 완화시킬 수 있는 생체내 관련성은 혈우병 환자 및 마우스의 연구로부터 유래한다. FV_{라이덴} 돌연변이는 지금 혈우병 인간 및 혈우병 마우스에서 질환 변형체인 것으로서 용된다(34, 38). 또한, 혈우병 마우스에 FVa의 약리학적 투여는 응고 프로파일(34) 뿐만 아니라 출혈을 개선시키는 것으로 입증되었고, 혈액 손실은 ^{수퍼}FVa에 의해 훨씬 더 효율적으로 제거했다.

[0290] 따라서, 본 발명자들은 ^{수퍼}FVa는 야생형 APC-유도 출혈의 예방 및 역전에 효과적이고, 이는 급성 외상성 응고 장애, 중증 패혈증 및 증가된 APC를 유도할 수 있는 다른 상태, 예를 들면, 급성 방사선 손상의 치료에 개입하기 위한 주요 관심사이다는 것을 입증했다(33). 본 발견은 트롬빈 생성 과정의 마지막 단계를 구성하는 프로트롬비나제 복합체 중의 보조 인자 활성화에 기인하는 프로-지혈제로서 ^{수퍼}FVa의 유용성을 시사한다. ^{수퍼}FVa에 의한 FVa 활성화 증가는 심각한 외상성 출혈 또는 소수의 치료 옵션이 지혈 조치를 구하는 생활에 충족되지 않은 임상적 필요성과 함께 존재하는 신규한 항응고제에 의한 출혈과 같은 중증 출혈을 치료하는데 관련된다.

[0291] 따라서, 요약하면, 본 결과는 ^{수퍼}FVa는 wt APC-유도 출혈의 예방 및 역전에서 단일 요법으로 또는 다른 응고촉진제와의 조합으로 효과적이라는 설득력 있는 증거를 제공한다. 혈우병에서 지혈을 향상시키는 것 이외에, ^{수퍼}FVa는 출혈이 wt APC에 의해 유도된 2가지 상이한 마우스 모델에서 출혈을 방지한다. 따라서, ^{수퍼}FVa는 출혈이 심각한 위험인 상황에서 프로-지혈제로서 사용되어야 한다.

[0292] 다음 참고 문헌들은 본 특허 출원서에 인용된다. 이러한 참고문헌 각각의 내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0293] 참고문헌

1. Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, Giangrande PL, Hill FG, Hay CR, Lee CA, Ludlam CA, and Williams M. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. *Blood*. 2007;110(3):815-25.
2. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeysens-Donadel S, van Geet C, Kenet G, Mäkipernaa A, Molinari AC, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med*. 2013;368(3):231-9.
3. Hay CR, DiMichele DM, and Study IIT. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood*. 2012;119(6):1335-44.
4. Hoots WK. Arthropathy in inhibitor patients: differences in the joint status. *Semin Hematol*. 2008;45(2 Suppl 1):S42-9.
5. Hoffman M, Monroe DM, and Roberts HR. Activated factor VII activates factors IX and X on the surface of activated platelets: thoughts on the mechanism of action of high-dose activated factor VII. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1998;9 Suppl 1(S61-5).
6. van't Veer C, and Mann KG. The regulation of the factor VII-dependent coagulation pathway: rationale for the effectiveness of recombinant factor VIIa in refractory bleeding disorders. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2000;26(4):367-72.
7. Astermark J, Donfield SM, DiMichele DM, Gringeri A, Gilbert SA, Waters J, Berntorp E, and Group FS. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. *Blood*. 2007;109(2):546-51.
8. Astermark J, Santagostino E, and Keith Hoots W. Clinical issues in inhibitors. *Haemophilia*. 2010;16 Suppl 5(54-60).
9. de Paula EV, Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz SR, Morfini M, Nemes L, Šalek SZ, Shima M, Windyga J, et al. Recombinant factor VIIa analog (vatreptacog alfa [activated]) for treatment of joint bleeds in hemophilia patients with inhibitors: a randomized controlled trial. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(1):81-9.
10. Møss J, Scharling B, Ezban M, and Møller Sørensen T. Evaluation of the safety and pharmacokinetics of a fast-acting recombinant FVIIa analogue, NN1731, in healthy male subjects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(2):299-305.

[0294]

11. Spira J, Plyushch O, Zozulya N, Yatuv R, Dayan I, Bleicher A, Robinson M, and Baru M. Safety, pharmacokinetics and efficacy of factor VIIa formulated with PEGylated liposomes in haemophilia A patients with inhibitors to factor VIII—an open label, exploratory, cross-over, phase I/II study. *Haemophilia*. 2010;16(6):910-8.
12. Milanov P, Ivanciu L, Abriss D, Quade-Lyssy P, Miesbach W, Alesci S, Tonn T, Grez M, Seifried E, and Schüttrumpf J. Engineered factor IX variants bypass FVIII and correct hemophilia A phenotype in mice. *Blood*. 2012;119(2):602-11.
13. Ivanciu L, Toso R, Margaritis P, Pavani G, Kim H, Schlachterman A, Liu JH, Clerin V, Pittman DD, Rose-Miranda R, et al. A zymogen-like factor Xa variant corrects the coagulation defect in hemophilia. *Nat Biotechnol*. 2011;29(11):1028-33.
14. Toso R, Zhu H, and Camire RM. The conformational switch from the factor X zymogen to protease state mediates exosite expression and prothrombinase assembly. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18627-35.
15. Mann KG, Jenny RJ, and Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annual review of biochemistry*. 1988;57(915-56.
16. Gale AJ, Xu X, Pellequer JL, Getzoff ED, and Griffin JH. Interdomain engineered disulfide bond permitting elucidation of mechanisms of inactivation of coagulation factor Va by activated protein C. *Protein Sci*. 2002;11(9):2091-101.
17. Lusher JM KC, Green D. *Acquired Hemophilia*. Princeton: Excerpta Medica, Inc. ; 1995.
18. Mesters RM, Houghten RA, and Griffin JH. Identification of a sequence of human activated protein C (residues 390-404) essential for its anticoagulant activity. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(36):24514-9.
19. Radtke KP, Griffin JH, Riceberg J, and Gale AJ. Disulfide bond-stabilized factor VIII has prolonged factor VIIla activity and improved potency in whole blood clotting assays. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(1):102-8.
20. Hemker HC, Giesen P, AIDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, and Beguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. 2002;32(5-6):249-53.
21. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001 Mar;344(10):699-709.
22. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med*. 2007 Oct;204(10):2439-48.
23. Mosnier LO, Yang XV, Griffin JH. Activated protein C mutant with minimal anticoagulant activity, normal cytoprotective activity, and preservation of thrombin activable fibrinolysis inhibitor-dependent cytoprotective functions. *J Biol Chem*. 2007 Nov;282(45):33022-33.
24. Gale AJ, Xu X, Pellequer JL, Getzoff ED, Griffin JH. Interdomain engineered disulfide bond permitting elucidation of mechanisms of inactivation of coagulation factor Va by activated protein C. *Protein Sci*. 2002 Sep;11(9):2091-101.
25. Burnier L, Fernández JA, Griffin JH. Antibody SPC-54 provides acute in vivo blockage of the murine protein C system. *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Apr;50(4):252-8.
26. MESTERS R, HOUGHTEN R, GRIFFIN J. IDENTIFICATION OF A SEQUENCE OF HUMAN ACTIVATED PROTEIN-C (RESIDUES 390-404) ESSENTIAL FOR

[0295]

- ITS ANTICOAGULANT ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 DEC 25 1991;266(36):24514-9.
27. Hemker H, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, et al. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): A universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2002 SEP-DEC 2002;32(5-6):249-53.
 28. Lu G, DeGuzman F, Hollenbach S, Karbarz M, Abe K, Lee G, et al. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nature Medicine*. 2013 APR 2013;19(4):446-+.
 29. Karakaya K, Ucan H, Tascilar O, Emre A, Cakmak G, Irkorucu O, et al. Evaluation of a New Hemostatic Agent Ankaferd Blood Stopper in Experimental Liver Laceration. *Journal of Investigative Surgery*. 2009 2009;22(3):201-6.
 30. Charbonneau S, Lemarie C, Peng H, Ganopolsky J, Shek P, Blostein M. Surface-attached amphipathic peptides reduce hemorrhage in vivo. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012 JAN 2012;72(1):136-42.
 31. Bajaj M, Ogueli G, Kumar Y, Vadivel K, Lawson G, Shanker S, et al. Engineering Kunitz Domain 1 (KD1) of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 to Selectively Inhibit Fibrinolysis PROPERTIES OF KD1-L17R VARIANT. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 FEB 2011;286(6):4329-40.
 32. Jasuja GK, Reisman JJ, Miller DR, Berlowitz DR, Hylek EM, Ash AS, et al. Identifying major hemorrhage with automated data: results of the Veterans Affairs study to improve anticoagulation (VARIA). *Thrombosis research*. 2013 Jan;131(1):31-6.
 33. Geiger H, Pawar SA, Kerschen EJ, Nattamai KJ, Hernandez I, Liang HP, et al. Pharmacological targeting of the thrombomodulin-activated protein C pathway mitigates radiation toxicity. *Nat Med*. 2012 Jul;18(7):1123-9.
 34. Schlachterman A, Schuettrumpf J, Liu JH, Furlan Freguia C, Toso R, Poncz M, et al. Factor V Leiden improves in vivo hemostasis in murine hemophilia models. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005 Dec;3(12):2730-7.
 35. Mei B, Pan C, Jiang H, Tjandra H, Strauss J, Chen Y, et al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. *Blood*. 2010 Jul 15;116(2):270-9.
 36. Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annual review of biochemistry*. 1988;57:915-56.
 37. Nesheim ME. A simple rate law that describes the kinetics of the heparin-catalyzed reaction between antithrombin III and thrombin. *J Biol Chem*. 1983 Dec 10;258(23):14708-17.
 38. Franchini M, Lippi G. Factor V Leiden and hemophilia. *Thrombosis research*. 2010 Feb;125(2):119-23.

References cited in examples 16 and 17.

- 1 Majeed A, Schulman S: Bleeding and antidotes in new oral anticoagulants. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26:191-202.
- 2 Siegal DM, Cuker A: Reversal of novel oral anticoagulants in patients with major bleeding. *J Thromb Thrombolysis* 2013;35:391-398.
- 3 Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener HC, Joyner CD, Wallentin L, Investigators R-LSCa: Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361:1139-1151.

[0296]

- 4 Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, Breithardt G, Halperin JL, Hankey GJ, Piccini JP, Becker RC, Nessel CC, Paolini JF, Berkowitz SD, Fox KA, Califf RM, Investigators RA: Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:883-891.
- 5 Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Gerdass M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FW, Zhu J, Wallentin L, Investigators Aca: Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:981-992.
- 6 Connolly SJ, Eikelboom J, Joyner C, Diener HC, Hart R, Golitsyn S, Flaker G, Avezum A, Hohnloser SH, Diaz R, Talajic M, Zhu J, Pais P, Budaj A, Parkhomenko A, Jansky P, Commerford P, Tan RS, Sim KH, Lewis BS, Van Mieghem W, Lip GY, Kim JH, Lanas-Zanetti F, Gonzalez-Hermosillo A, Dans AL, Munawar M, O'Donnell M, Lawrence J, Lewis G, Afzal R, Yusuf S, Investigators ASCa: Apixaban in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;364:806-817.
- 7 Prins MH, Lensing AW, Bauersachs R, van Bellen B, Bounameaux H, Brighton TA, Cohen AT, Davidson BL, Decousus H, Raskob GE, Berkowitz SD, Wells PS, Investigators E: Oral rivaroxaban versus standard therapy for the treatment of symptomatic venous thromboembolism: A pooled analysis of the einstein-dvt and pe randomized studies. *Thromb J* 2013;11:21.
- 8 Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Mismetti P, Schellong S, Eriksson H, Baanstra D, Schnee J, Goldhaber SZ, Group R-CS: Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2009;361:2342-2352.
- 9 Quinlan DJ, Eikelboom JW, Weitz JI: Four-factor prothrombin complex concentrate for urgent reversal of vitamin K antagonists in patients with major bleeding. *Circulation* 2013;128:1179-1181.
- 10 Pabinger I, Brenner B, Kalina U, Knaub S, Nagy A, Ostermann H, Group BPNARS: Prothrombin complex concentrate (beriplex p/n) for emergency anticoagulation reversal: A prospective multinational clinical trial. *J Thromb Haemost* 2008;6:622-631.
- 11 Lippi G, Favaloro EJ, Cervellin G: Massive posttraumatic bleeding: Epidemiology, causes, clinical features, and therapeutic management. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:83-93.
- 12 Logan AC, Goodnough LT: Recombinant factor viia: An assessment of evidence regarding its efficacy and safety in the off-label setting. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:153-159.
- 13 Marlu R, Hodaj E, Paris A, Albaladejo P, Cracowski JL, Crackowski JL, Pernod G: Effect of non-specific reversal agents on anticoagulant activity of dabigatran and rivaroxaban: A randomised crossover ex vivo study in healthy volunteers. *Thromb Haemost* 2012;108:217-224.
- 14 Skolnick BE, Mathews DR, Khutoryansky NM, Pusateri AE, Carr ME: Exploratory study on the reversal of warfarin with rfviia in healthy subjects. *Blood* 2010;116:693-701.
- 15 Tanaka KA, Gruber A, Szlam F, Bush LA, Hanson SR, Di Cera E: Interaction between thrombin mutant w215a/e217a and direct thrombin inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008;19:465-468.
- 16 Schiele F, van Ryn J, Canada K, Newsome C, Sepulveda E, Park J, Nar H, Litzemberger T: A specific antidote for dabigatran: Functional and structural characterization. *Blood* 2013;121:3554-3562.
- 17 Lu G, DeGuzman FR, Hollenbach SJ, Karbarz MJ, Abe K, Lee G, Luan P, Hutchaleelaha A, Inagaki M, Conley PB, Phillips DR, Sinha U: A specific antidote for

[0297]

reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor xa. Nat Med 2013;19:446-451.

18 Mesters RM, Houghten RA, Griffin JH: Identification of a sequence of human activated protein c (residues 390-404) essential for its anticoagulant activity. The Journal of biological chemistry 1991;266:24514-24519.

19 Gale AJ, Xu X, Pellequer JL, Getzoff ED, Griffin JH: Interdomain engineered disulfide bond permitting elucidation of mechanisms of inactivation of coagulation factor va by activated protein c. Protein science : a publication of the Protein Society 2002;11:2091-2101.

20 Radtke KP, Griffin JH, Riceberg J, Gale AJ: Disulfide bond-stabilized factor viii has prolonged factor viii activity and improved potency in whole blood clotting assays. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 2007;5:102-108.

21 Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S: The calibrated automated thrombogram (cat): A universal routine test for hyper- and hypocoagulability. Pathophysiology of haemostasis and thrombosis 2002;32:249-253.

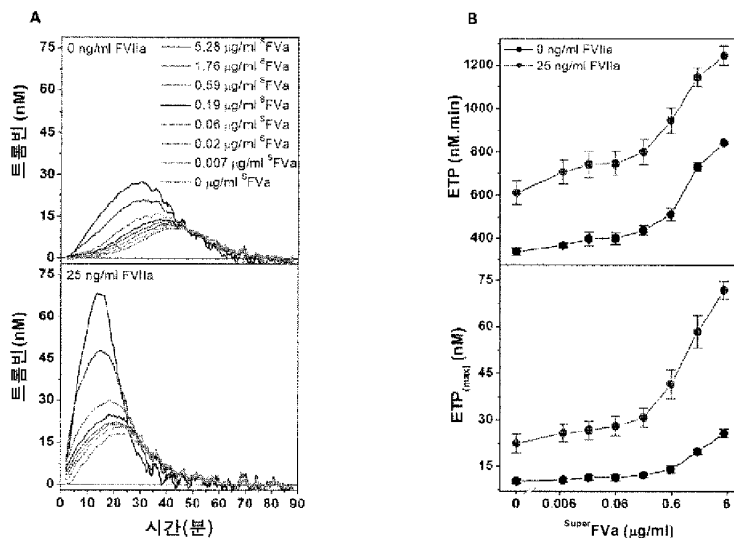
22 Frost C, Nepal S, Wang J, Schuster A, Byon W, Boyd RA, Yu Z, Shenker A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, Lacrete F: Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor xa inhibitor, in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol 2013;76:776-786.

23 Kubitz D, Becka M, Mueck W, Zuehlendorf M: Rivaroxaban (bay 59-7939)--an oral, direct factor xa inhibitor--has no clinically relevant interaction with naproxen. Br J Clin Pharmacol 2007;63:469-476.

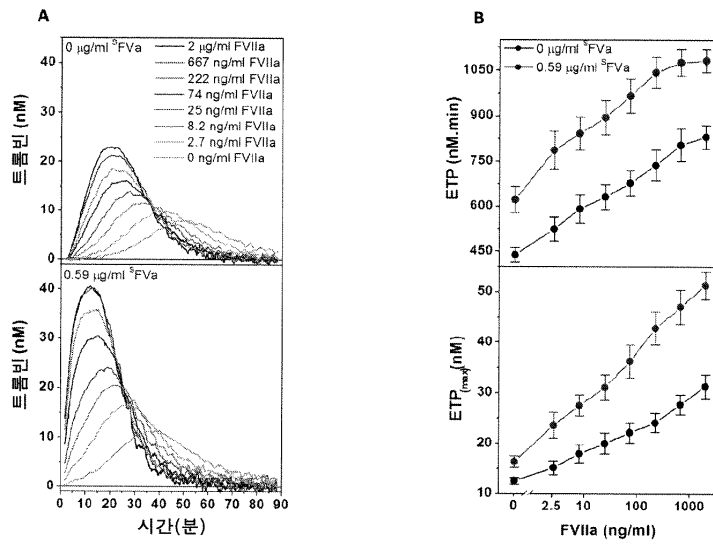
[0298]

도면

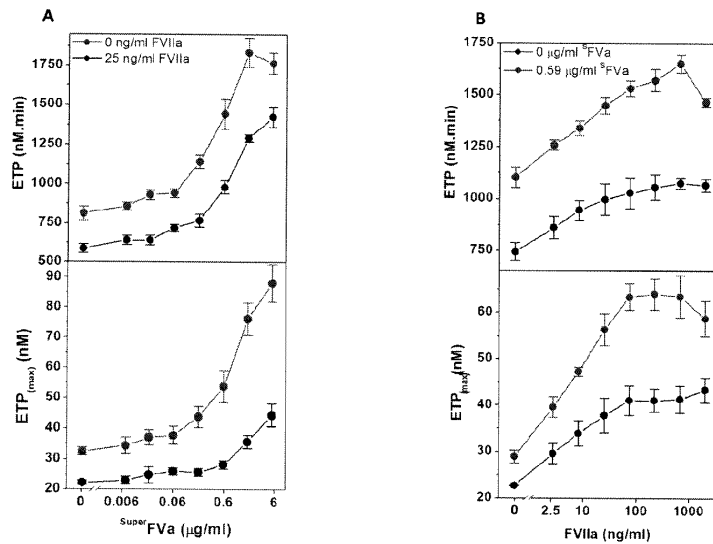
도면1



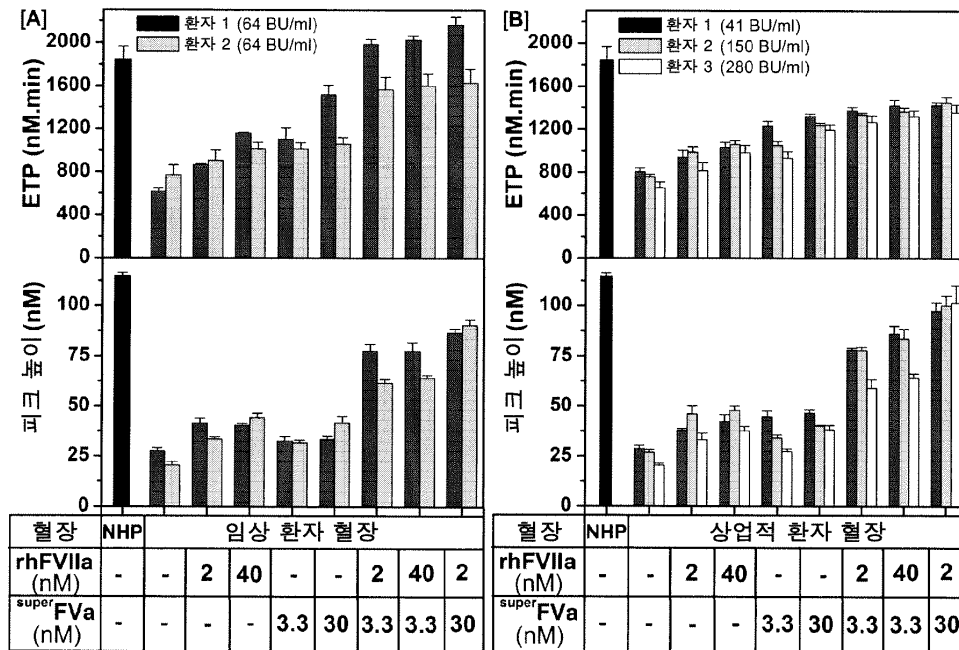
도면2



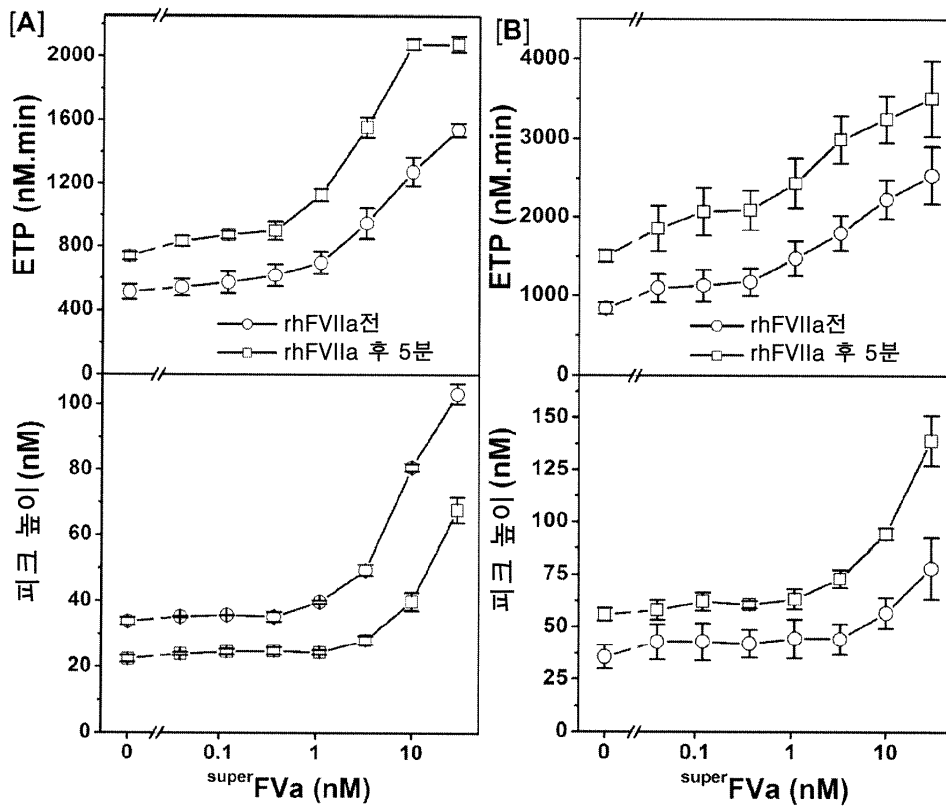
도면3



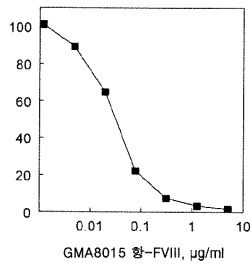
도면4



도면5

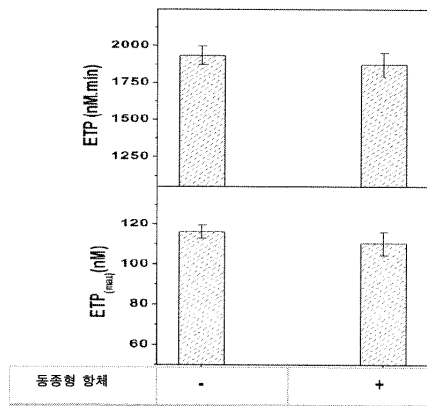


도면6



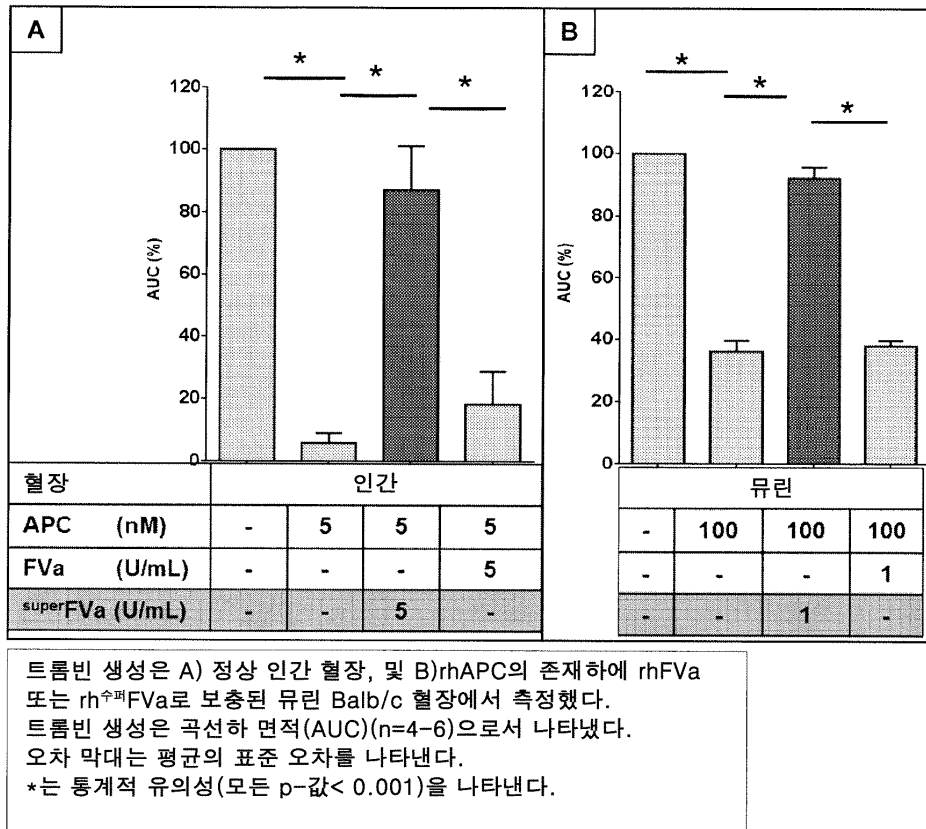
GMA8015 항-FVIII의 베타스타역가. FVIII억제 활성은 문헌 [참조: Barrow and Lollar, JTH, 2006]에 기재된 프로토콜에 따라 변형된 나이페겐베스타 검정에 따라 측정했다. 50% FVIII 활성은 0.031 μg/ml의 GMA8015로 잔류했다. 이는 32,300BU/mg의 GMA8015를 유도한다.

도면7

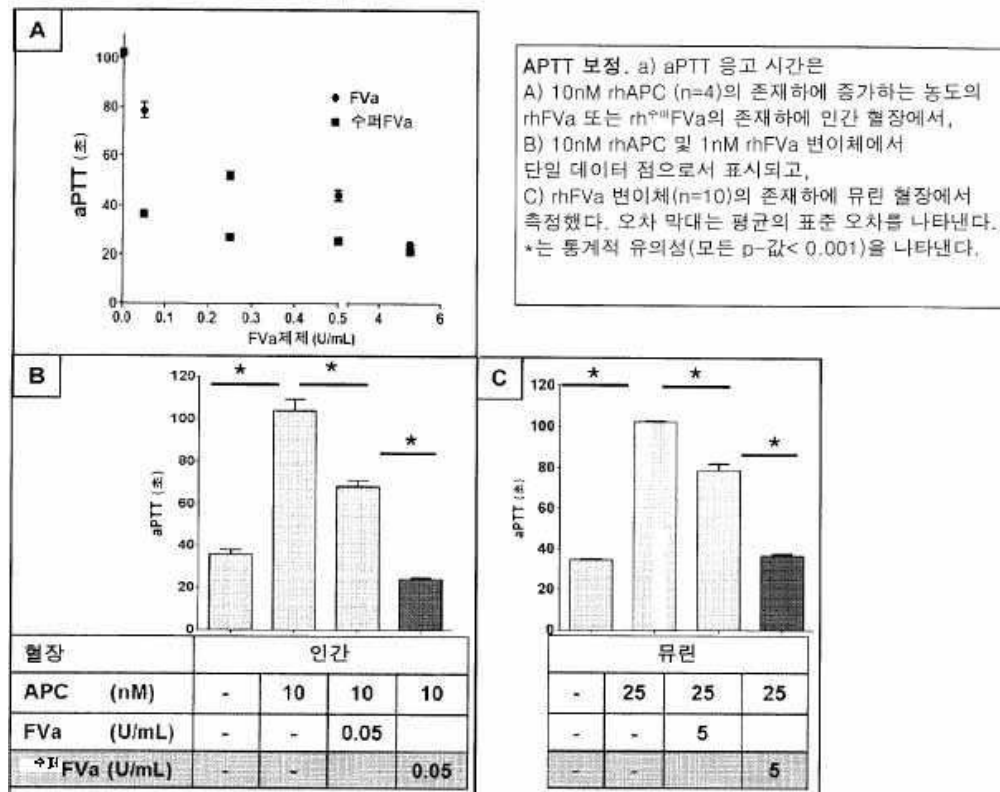


동중형 항체를 사용하거나 사용하지 않고 정상 인간 혈장에서 트롬빈 생성. 트롬빈 생성은 곡선화 면적(상부 패널) 및 키프 높이 (하부 패널)로서 표현된. 1.25 μg/ml 동중형 항체의 존재 또는 부재하에 정상 풀링된 인간 혈장에서 내생적 트롬빈 잠재력(ETP)으로서 풀링된 정상 인간에서 측정했다. 오차 막대는 평균(n≥3)의 표준 오차를 나타낸다.

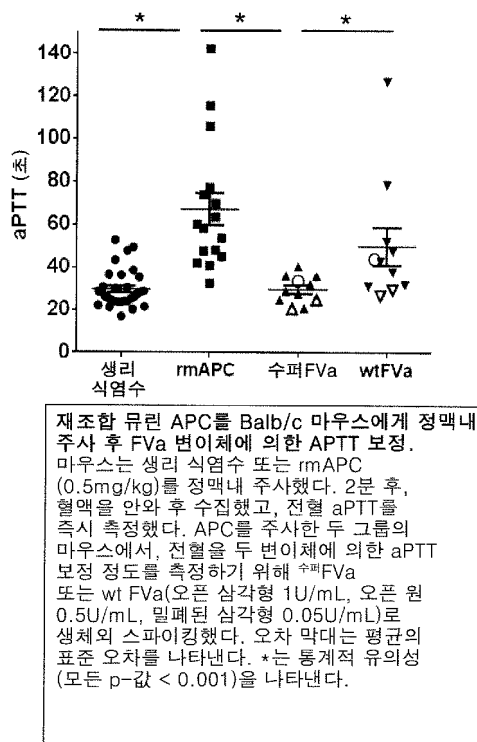
도면8



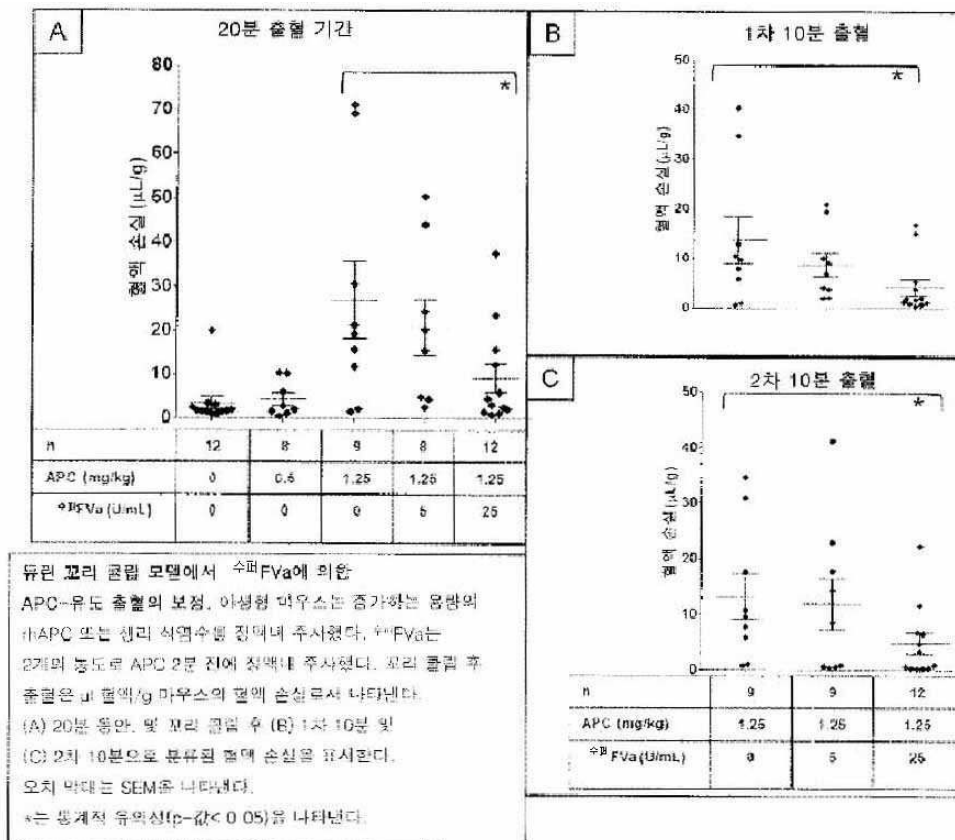
도면9



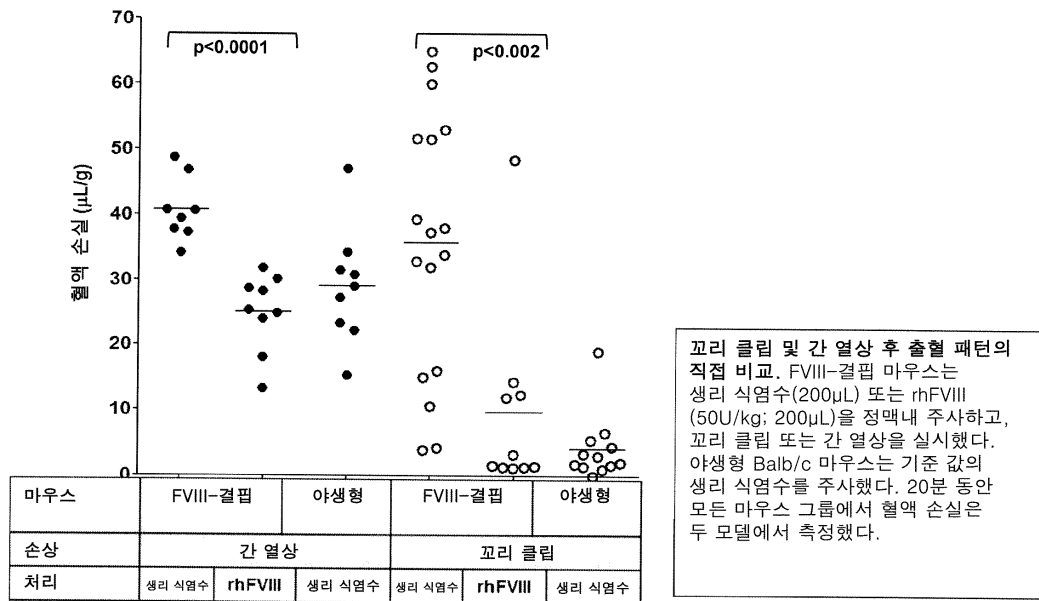
도면10



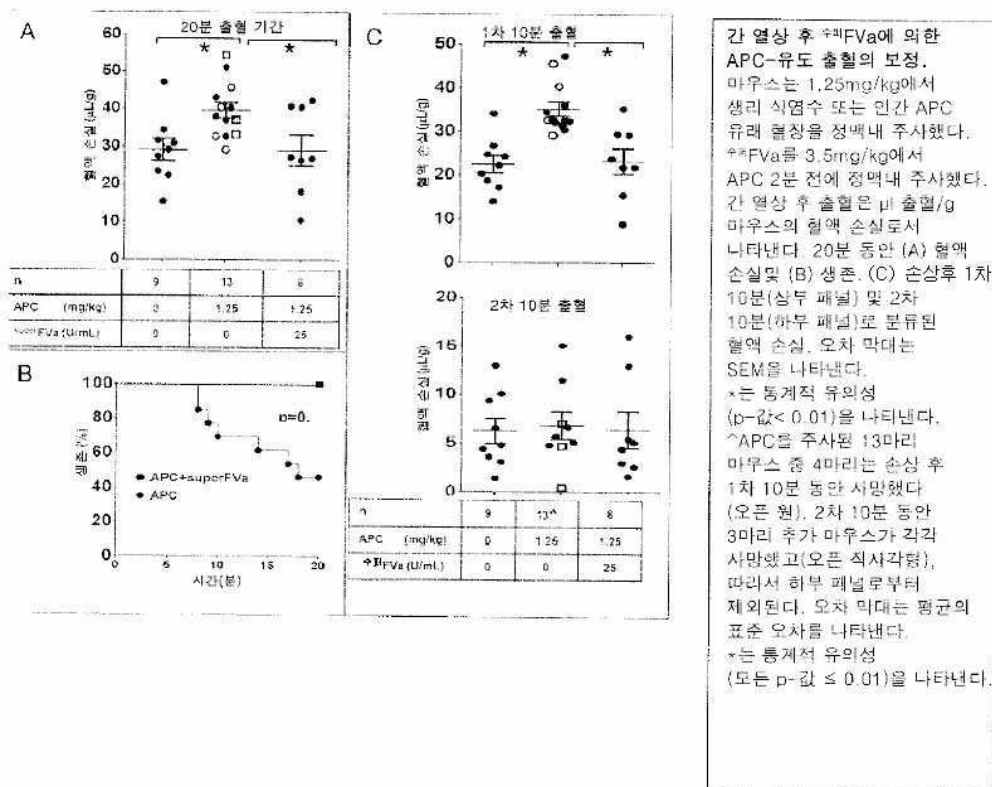
도면11



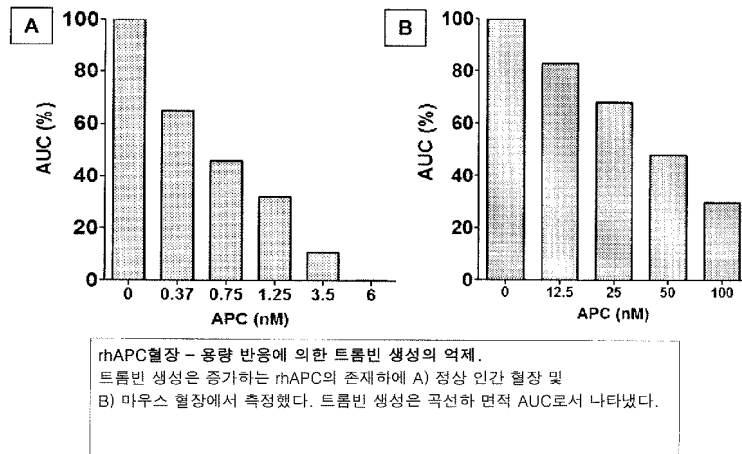
도면12



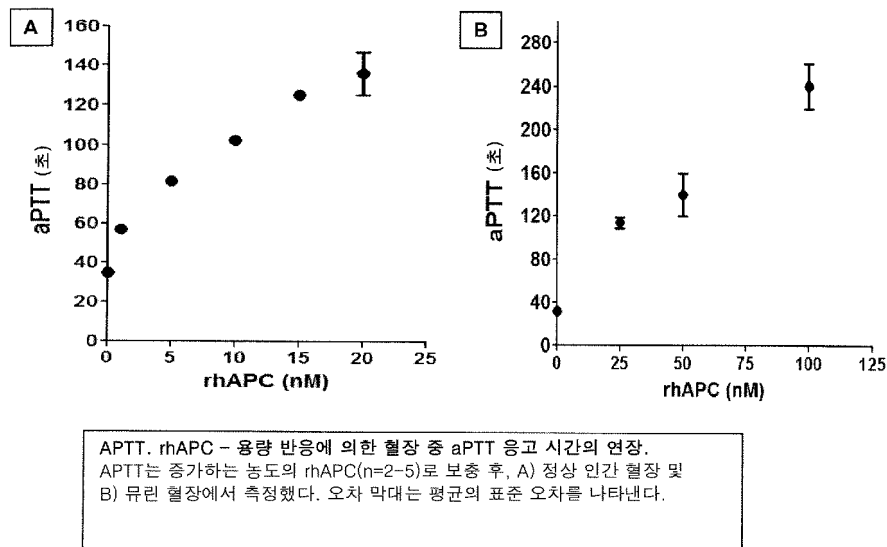
도면13



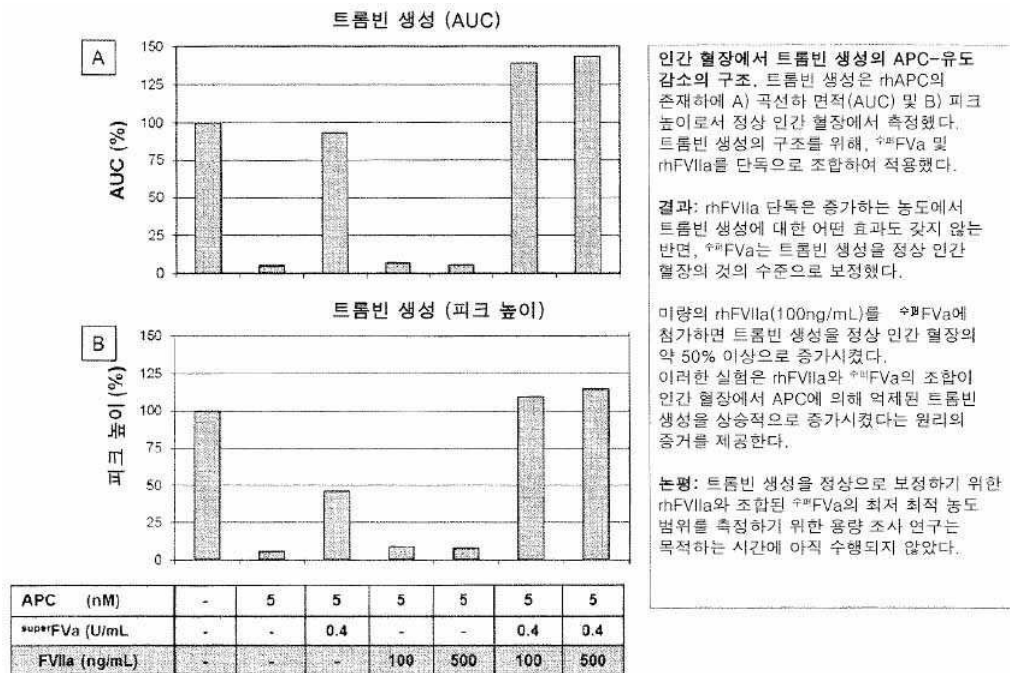
도면14



도면15

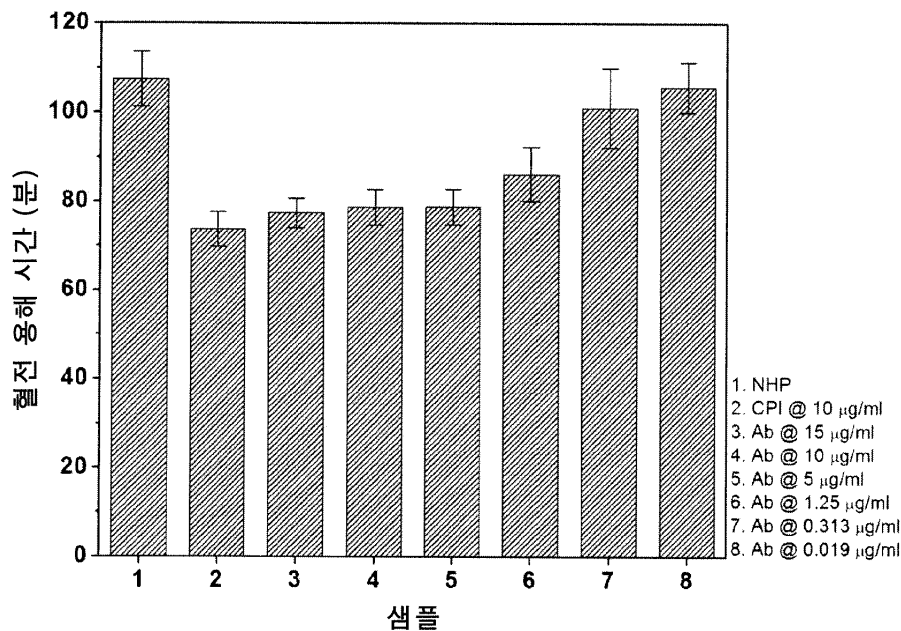


도면16

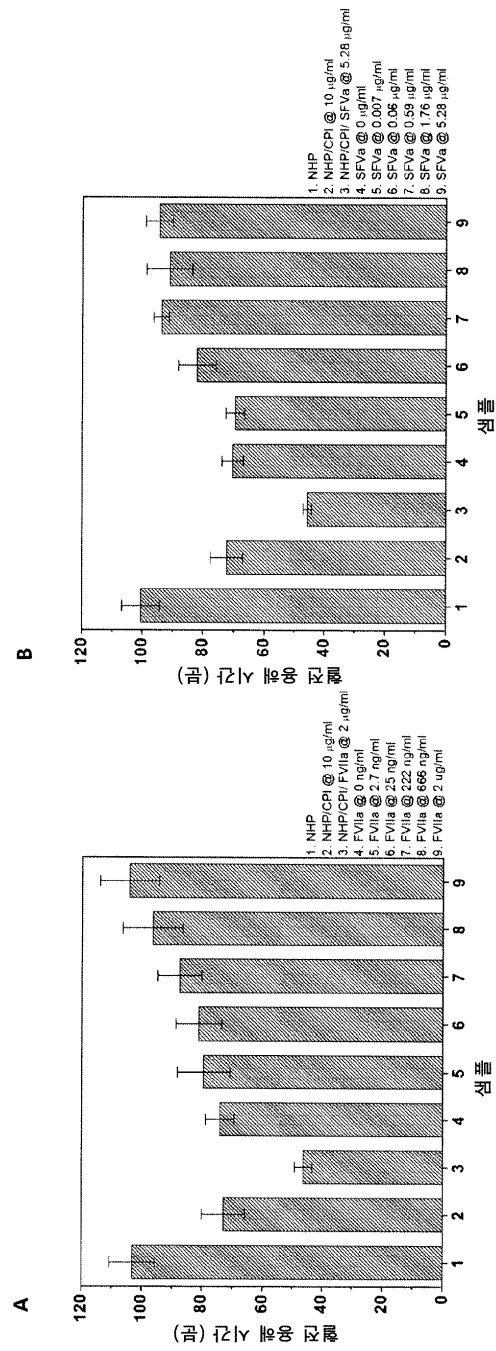


도면17

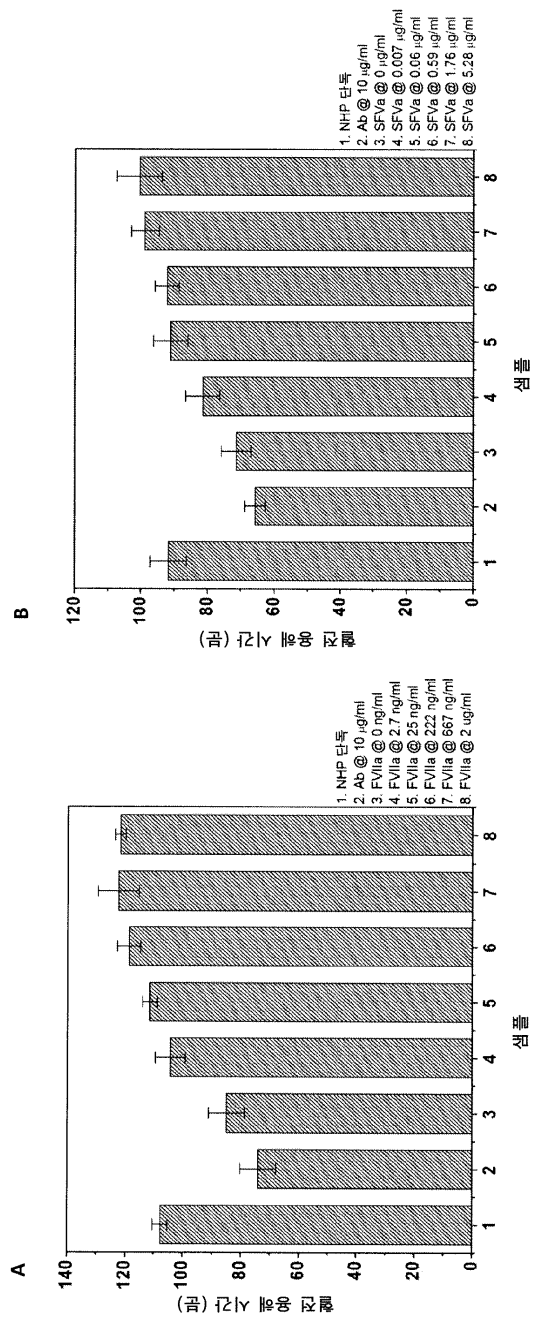
정상 인간 혈장의 혈전 용해에 대한 항-FVIII 항체(억제제)의 효과



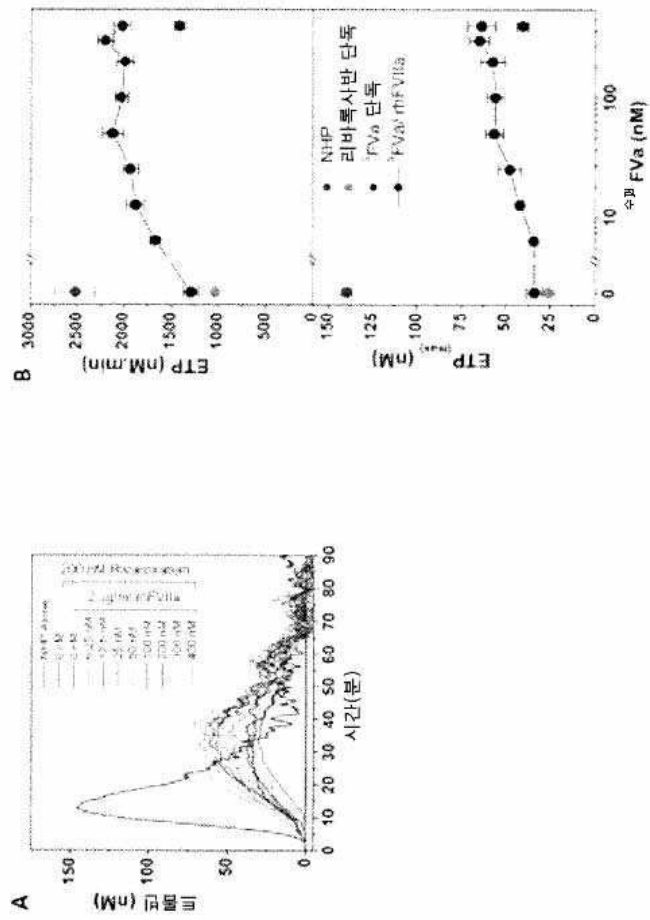
도면18



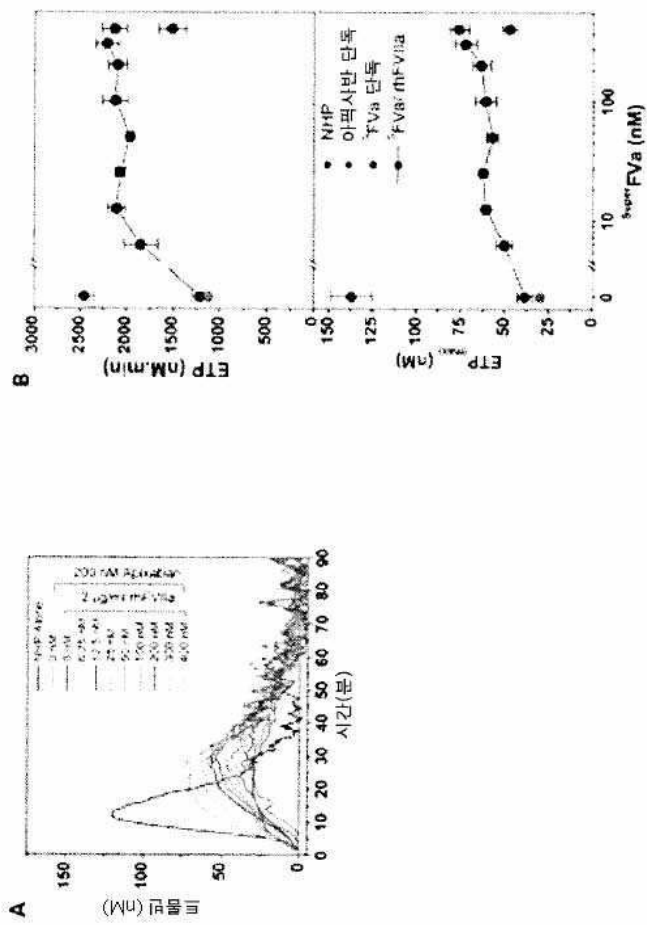
도면19



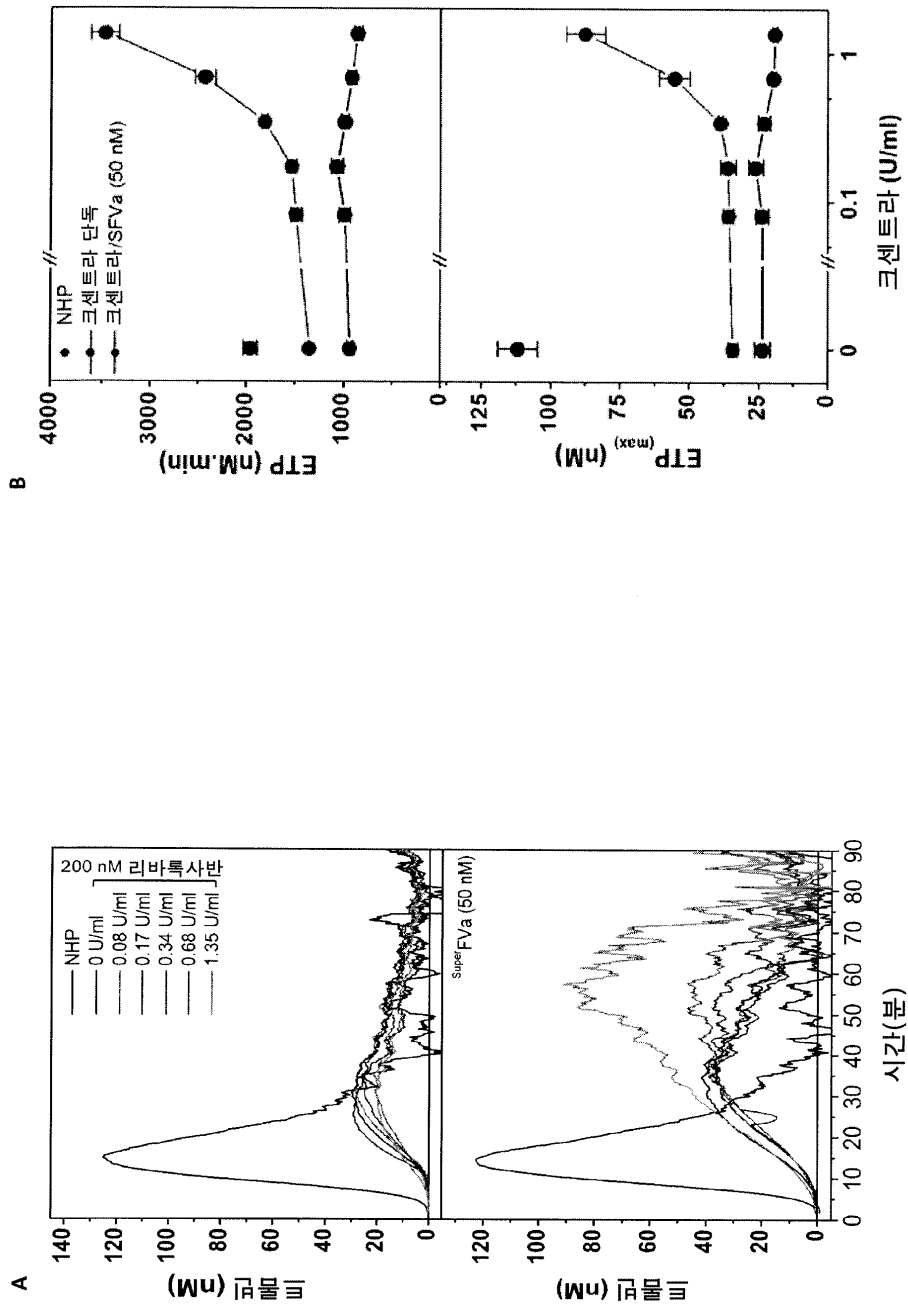
도면20



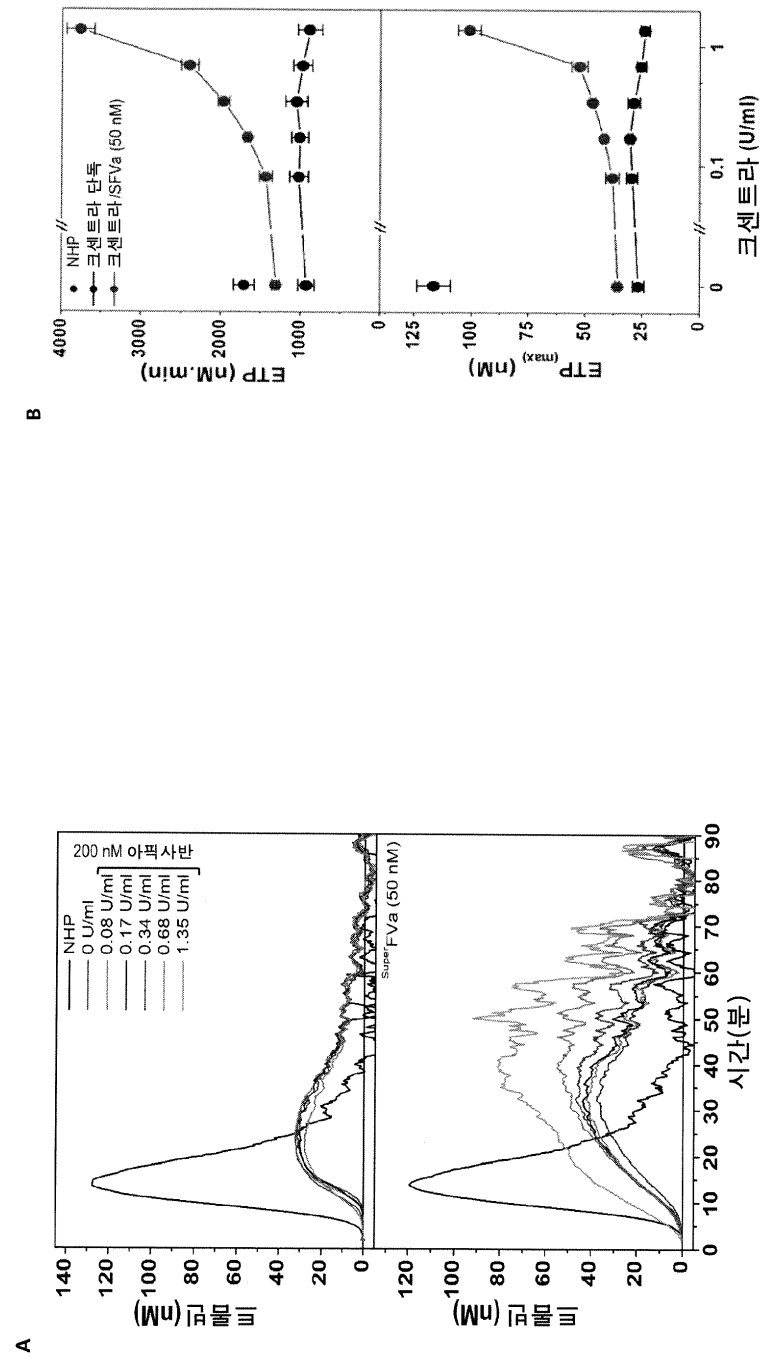
도면21



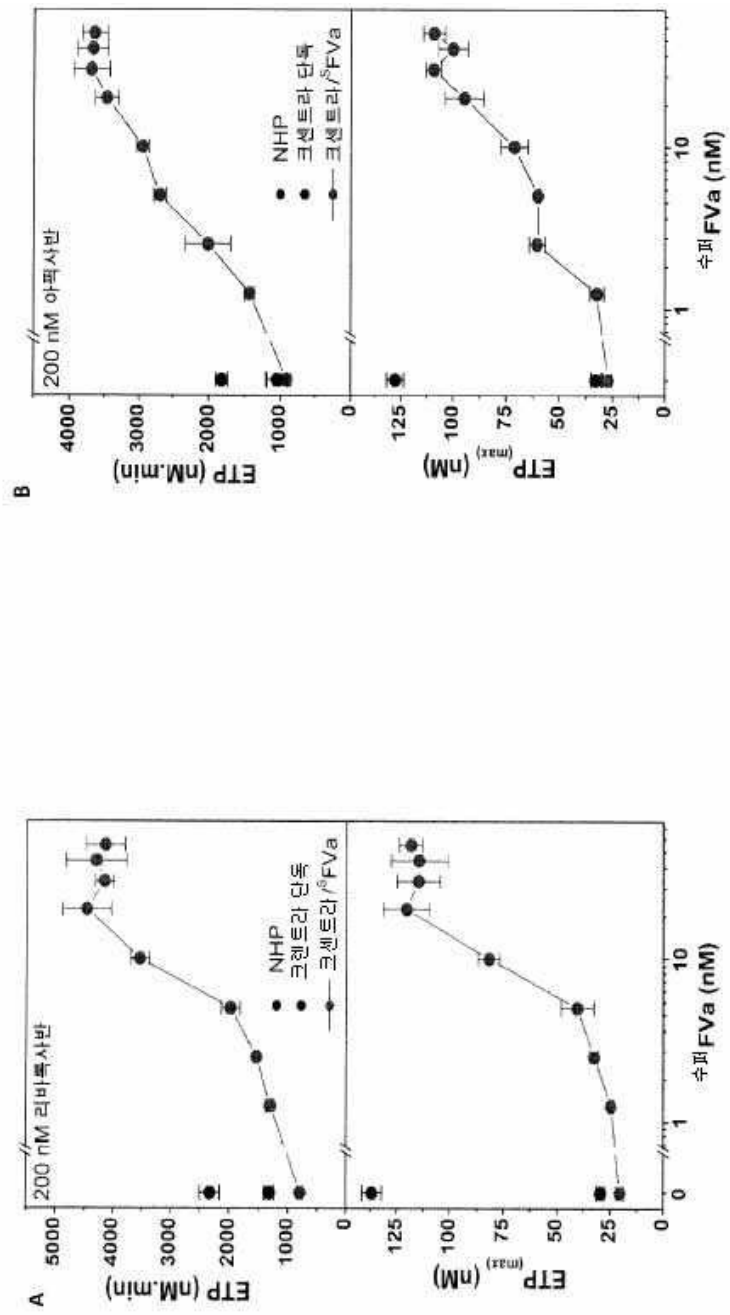
도면22



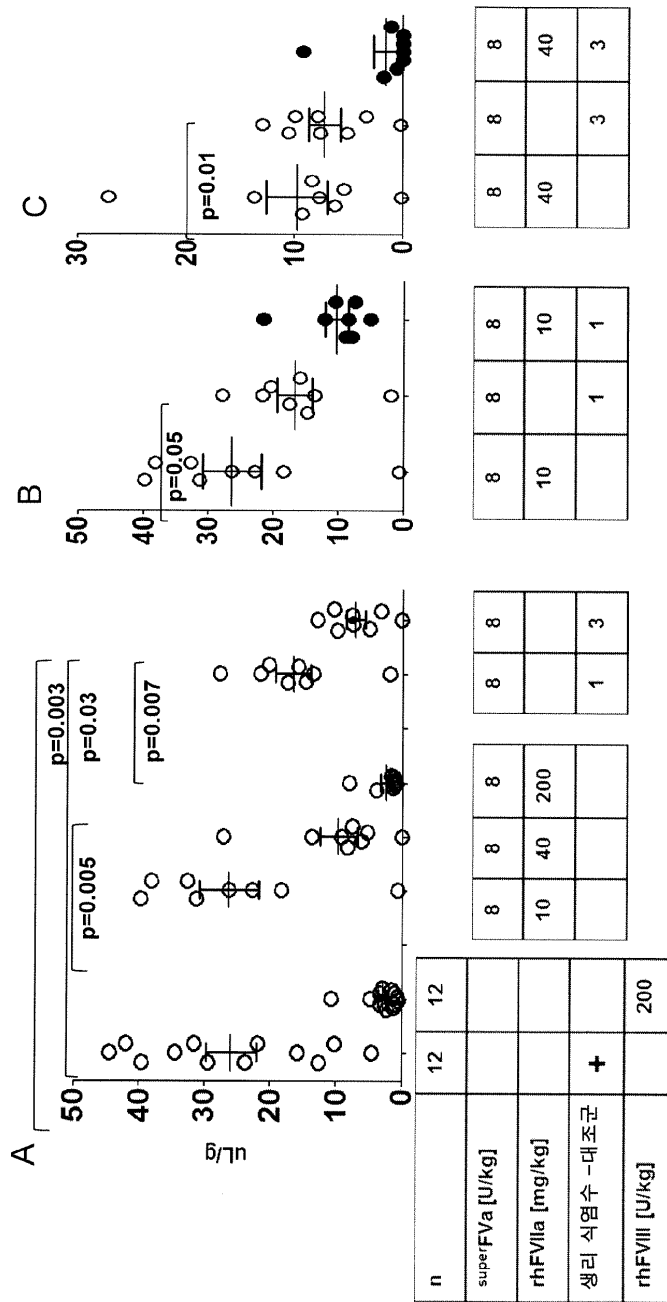
도면23



도면24

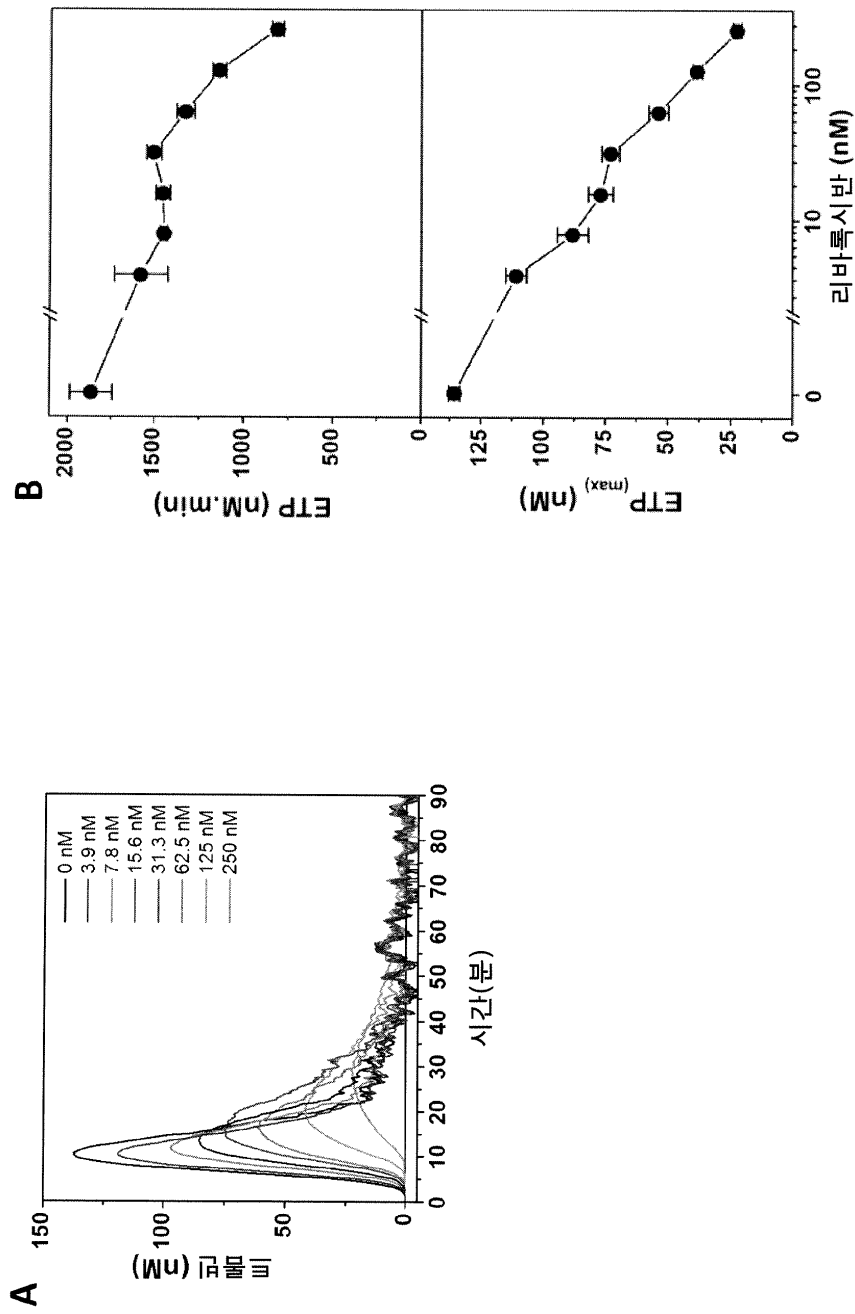


도면25

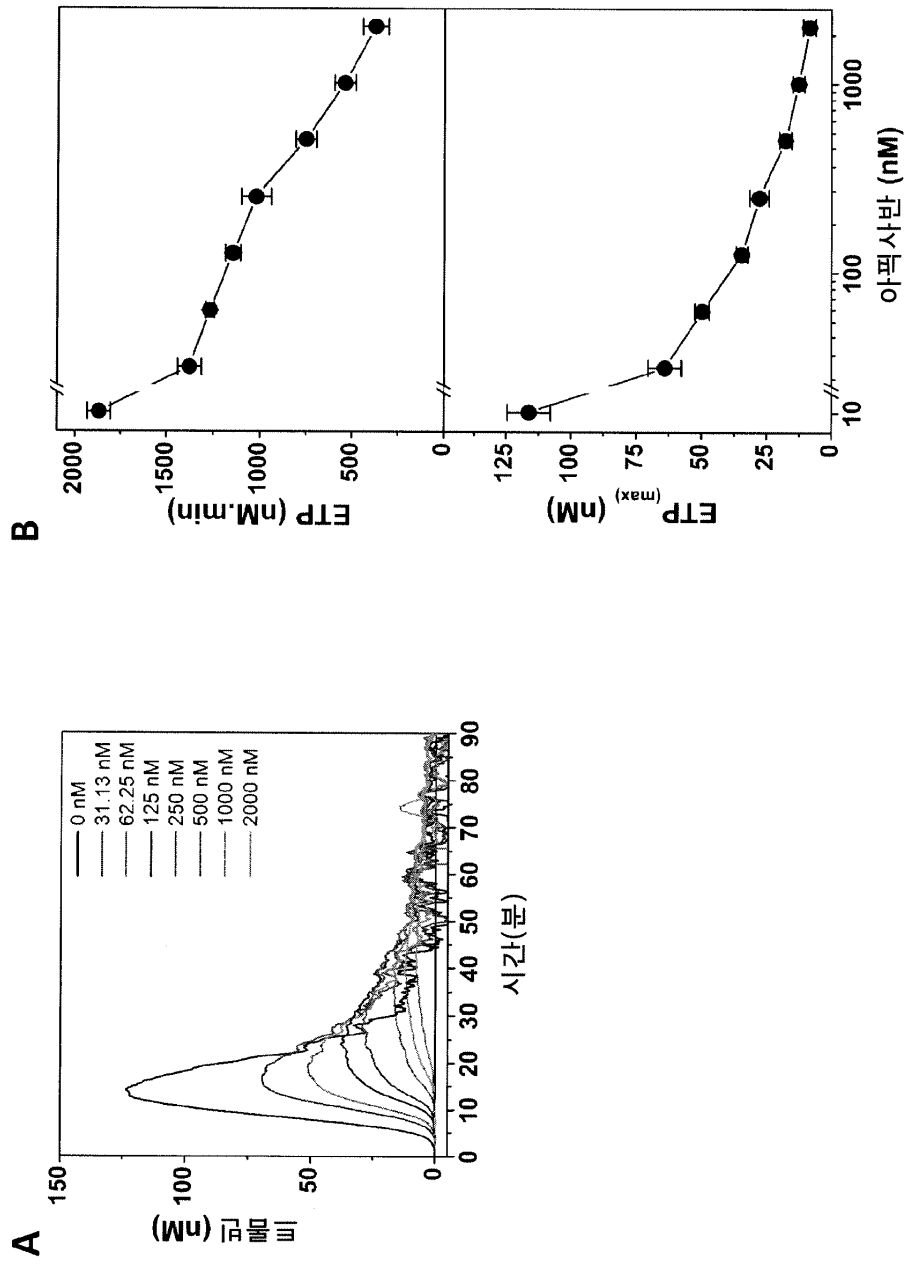


superFVa와 조합된 rhFVIIa의 주사 후 출혈 보정은 FVIII에 의한 출혈 보정과 유사하다. FVIII-결핍 마우스는 생리 식염수, rhFVIII, 증가하는 용량의 superFVa, rhFVIIa 또는 superFVa (1단위 = 프로트롬비나제 검정에서 20nM 야생형 FVa의 활성)와 조합된 rhFVIIa를 정맥내 주사했다. 출혈은 꼬리 클립 후 20분 동안 측정했고, μ l 혈액/g 마우스의 혈액 손실로서 나타냈다. 오차 막대는 SEM를 나타낸다. A) 생리 식염수, rhFVIII 및 증가하는 용량의 superFVa 또는 rhFVIIa, B) 저용량 또는 C) 중간 용량의 superFVa 또는 rhFVIIa를 단독으로 및 조합하여 주사한 마우스에서 혈액 손실.

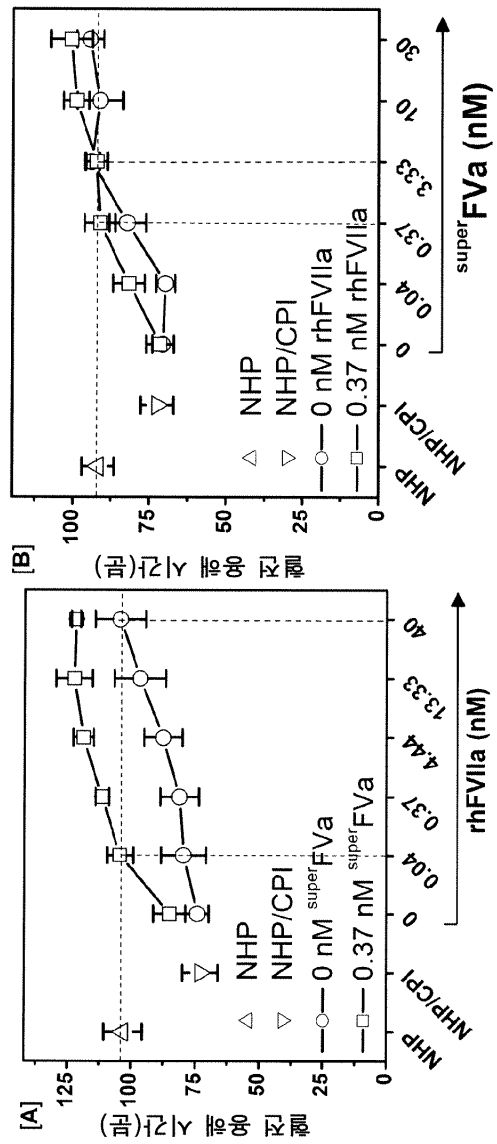
도면26



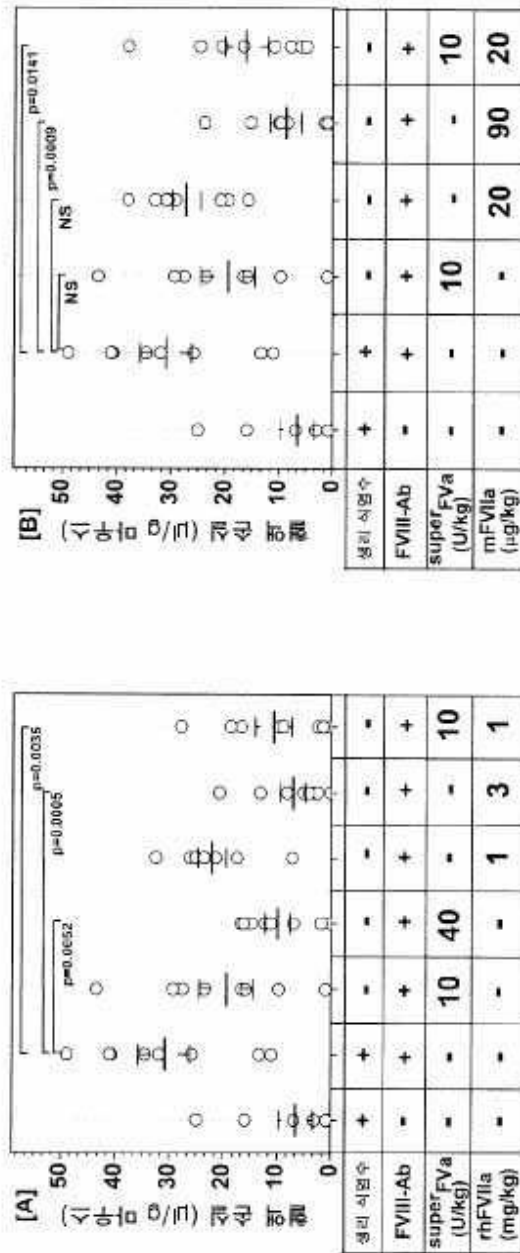
도면27



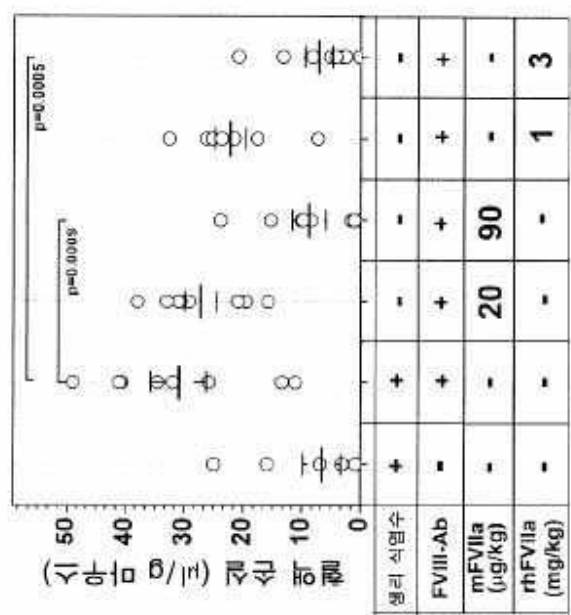
도면28



도면29



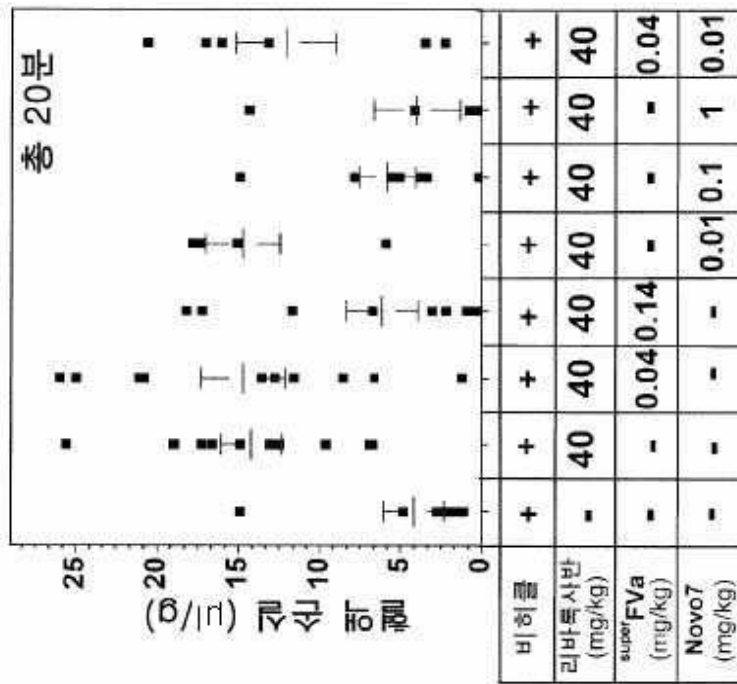
도면30



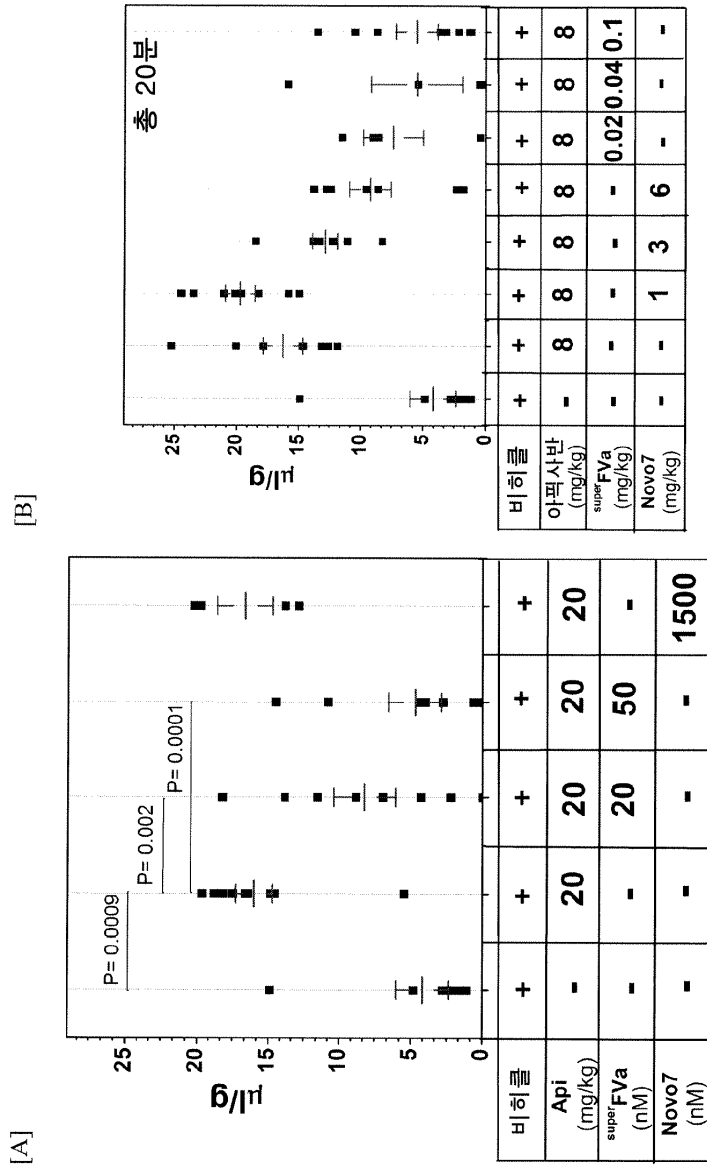
도면31

[A]	항-FVIII 항체를 갖는 NHP			
	superFVa (nM)		rhFVIIa (nM)	
	0	0.37	0	0.37
rhFVIIa (nM)	40	0.04	-	-
superFVa (nM)	-	-	3.33	0.37

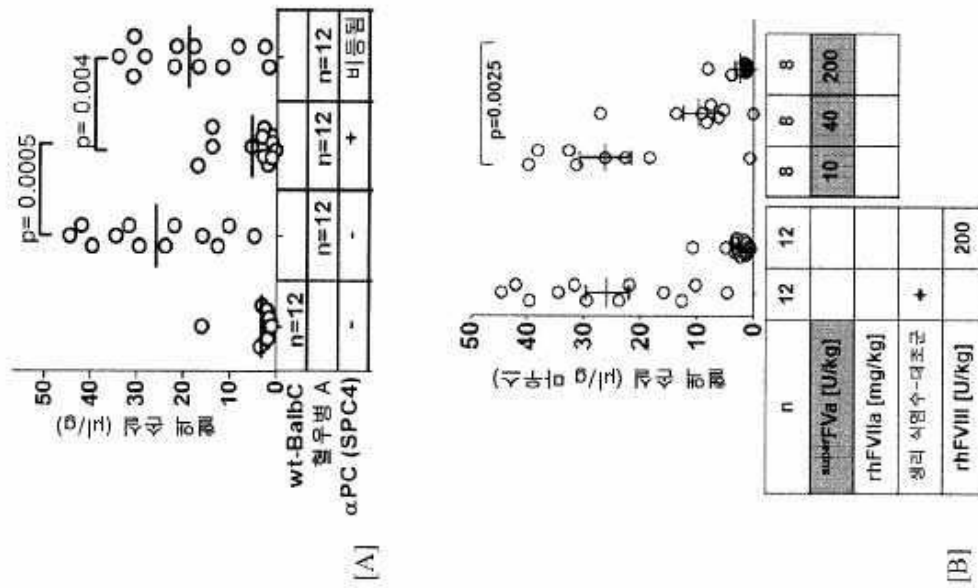
도면32



도면33



도면34



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
GRIFFIN, JOHN H.
MOSNIER, LAURENT
- <120> THERAPY FOR TREATMENT OR PREVENTION OF CONDITIONS ASSOCIATED WITH
BLEEDING OR HYPOCOAGULATION
- <130> 41112.1013
- <140> PCT/US2014/063898
- <141> 2014-11-04
- <150> US 61/899,544
- <151> 2013-11-04
- <150> US 61/944,915
- <151> 2014-02-26
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> superFVa

<400> 1

Ala Gln Leu Arg Gln Phe Tyr Val Ala Ala Gln Gly Ile Ser Trp Ser

1 5 10 15

Tyr Arg Pro Glu Pro Thr Asn Ser Ser Leu Asn Leu Ser Val Thr Ser

20 25 30

Phe Lys Lys Ile Val Tyr Arg Glu Tyr Glu Pro Tyr Phe Lys Lys Glu

35 40 45

Lys Pro Gln Ser Thr Ile Ser Gly Leu Leu Gly Pro Thr Leu Tyr Ala

50 55 60

Glu Val Gly Asp Ile Ile Lys Val His Phe Lys Asn Lys Ala Asp Lys

65 70 75 80

Pro Leu Ser Ile His Pro Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Lys Leu Ser Glu

85 90 95

Gly Ala Ser Tyr Leu Asp His Thr Phe Pro Ala Glu Lys Met Asp Asp

100 105 110

Ala Val Ala Pro Gly Arg Glu Tyr Thr Tyr Glu Trp Ser Ile Ser Glu

115 120 125

Asp Ser Gly Pro Thr His Asp Asp Pro Pro Cys Leu Thr His Ile Tyr

130 135 140

Tyr Ser His Glu Asn Leu Ile Glu Asp Phe Asn Ser Gly Leu Ile Gly

145 150 155 160

Pro Leu Leu Ile Cys Lys Lys Gly Thr Leu Thr Glu Gly Gly Thr Gln

165 170 175

Lys Thr Phe Asp Lys Gln Ile Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu

180 185 190

Ser Lys Ser Trp Ser Gln Ser Ser Ser Leu Met Tyr Thr Val Asn Gly

195 200 205

Tyr Val Asn Gly Thr Met Pro Asp Ile Thr Val Cys Ala His Asp His

210 215 220

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

465 470 475 480
 Val Asp Ile Met Arg Asp Ile Ala Ser Gly Leu Ile Gly Leu Leu Leu
 485 490 495
 Ile Cys Lys Ser Arg Ser Leu Asp Arg Gln Gly Ile Gln Arg Ala Ala

 500 505 510
 Asp Ile Glu Gln Gln Ala Val Phe Ala Val Phe Asp Glu Asn Lys Ser
 515 520 525
 Trp Tyr Leu Glu Asp Asn Ile Asn Lys Phe Cys Glu Asn Pro Asp Glu
 530 535 540
 Val Lys Arg Asp Asp Pro Lys Phe Tyr Glu Ser Asn Ile Met Ser Thr
 545 550 555 560
 Ile Asn Gly Tyr Val Pro Glu Ser Ile Thr Thr Leu Gly Phe Cys Phe

 565 570 575
 Asp Asp Thr Val Gln Trp His Phe Cys Ser Val Gly Thr Gln Asn Glu
 580 585 590
 Ile Leu Thr Ile His Phe Thr Gly His Ser Phe Ile Tyr Gly Lys Arg
 595 600 605
 Cys Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Met Arg Gly Glu Ser Val Thr
 610 615 620
 Val Thr Met Asp Asn Val Gly Thr Trp Met Leu Thr Ser Met Asn Ser

 625 630 635 640
 Ser Pro Arg Ser Lys Lys Leu Arg Leu Lys Phe Arg Asp Val Lys Cys
 645 650 655
 Ile Pro Asp Asp Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Ile Phe Glu Pro Pro Glu
 660 665 670
 Ser Thr Val Met Ala Thr Gln Lys Met His Asp Arg Leu Glu Pro Glu
 675 680 685
 Asp Glu Glu Ser Asp Ala Asp Tyr Asp Tyr Gln Asn Arg Leu Ala Ala

 690 695 700
 Ala Leu Gly Ile Arg Ser Phe Arg Asn Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu
 705 710 715 720

Glu Glu Phe Asn Leu Thr Ala Leu Ala Leu Glu Asn Gly Thr Glu Phe
 725 730 735
 Val Ser Ser Asn Thr Asp Ile Ile Val Gly Ser Asn Tyr Ser Ser Pro
 740 745 750
 Ser Asn Ile Ser Lys Phe Thr Val Asn Asn Leu Ala Glu Pro Gln Lys
 755 760 765
 Ala Pro Ser His Gln Gln Ala Thr Thr Ala Gly Ser Pro Leu Arg His
 770 775 780
 Leu Ile Gly Lys Asn Ser Val Leu Asn Ser Ser Thr Ala Glu His Ser
 785 790 795 800
 Ser Pro Tyr Ser Glu Asp Pro Ile Glu Asp Pro Thr Asp Tyr Ile Glu
 805 810 815
 Ile Ile Pro Lys Glu Glu Val Gln Ser Ser Glu Asp Asp Tyr Ala Glu
 820 825 830
 Ile Asp Tyr Val Pro Tyr Asp Asp Pro Tyr Lys Thr Asp Val Arg Thr
 835 840 845
 Asn Ile Asn Ser Ser Arg Asp Pro Asp Asn Ile Ala Ala Trp Tyr Leu
 850 855 860
 Arg Ser Asn Asn Gly Asn Arg Arg Asn Tyr Tyr Ile Ala Ala Glu Glu
 865 870 875 880
 Ile Ser Trp Asp Tyr Ser Glu Phe Val Gln Arg Glu Thr Asp Ile Glu
 885 890 895
 Asp Ser Asp Asp Ile Pro Glu Asp Thr Thr Tyr Lys Lys Val Val Phe
 900 905 910
 Arg Lys Tyr Leu Asp Ser Thr Phe Thr Lys Arg Asp Pro Arg Gly Glu
 915 920 925
 Tyr Glu Glu His Leu Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Glu Val
 930 935 940
 Asp Asp Val Ile Gln Val Arg Phe Lys Asn Leu Ala Ser Arg Pro Tyr
 945 950 955 960
 Ser Leu His Ala His Gly Leu Ser Tyr Glu Lys Ser Ser Glu Gly Lys

965	970	975
Thr Tyr Glu Asp Asp Ser Pro Glu Trp Phe Lys Glu Asp Asn Ala Val		
980	985	990
Gln Pro Asn Ser Ser Tyr Thr Tyr Val Trp His Ala Thr Glu Arg Ser		
995	1000	1005
Gly Pro Cys Ser Pro Gly Ser Ala Cys Arg Ala Trp Ala Tyr Tyr		
1010	1015	1020
Ser Ala Val Asn Pro Glu Lys Asp Ile His Ser Gly Leu Ile Gly		
1025	1030	1035
Pro Leu Leu Ile Cys Gln Lys Gly Ile Leu His Lys Asp Ser Asn		
1040	1045	1050
Met Pro Val Asp Met Arg Glu Phe Val Leu Leu Phe Met Thr Phe		
1055	1060	1065
Asp Glu Lys Lys Ser Trp Tyr Tyr Glu Lys Lys Ser Arg Ser Ser		
1070	1075	1080
Trp Arg Leu Thr Ser Ser Glu Met Lys Lys Ser His Glu Phe His		
1085	1090	1095
Ala Ile Asn Gly Met Ile Tyr Ser Leu Pro Gly Leu Lys Met Tyr		
1100	1105	1110
Glu Gln Glu Trp Val Arg Leu His Leu Leu Asn Ile Gly Gly Ser		
1115	1120	1125
Gln Asp Ile His Val Val His Phe His Gly Gln Thr Leu Leu Glu		
1130	1135	1140
Asn Gly Asn Lys Gln His Gln Leu Gly Val Trp Pro Leu Leu Pro		
1145	1150	1155
Gly Ser Phe Lys Thr Leu Glu Met Lys Ala Ser Lys Pro Gly Trp		
1160	1165	1170
Trp Leu Leu Asn Thr Glu Val Gly Glu Asn Gln Arg Ala Gly Met		
1175	1180	1185
Gln Thr Pro Phe Leu Ile Met Asp Arg Asp Cys Arg Met Pro Met		
1190	1195	1200

Gly Leu Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Lys Ala Ser		
1205	1210	1215
Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Glu Pro Arg Leu Ala Arg Leu Asn Asn		
1220	1225	1230
Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu Lys Leu Ala Ala Glu		
1235	1240	1245
Phe Ala Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asp Met Gln Lys Glu Val		
1250	1255	1260
Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala Lys His Tyr Leu Lys		
1265	1270	1275
Ser Cys Tyr Thr Thr Glu Phe Tyr Val Ala Tyr Ser Ser Asn Gln		
1280	1285	1290
Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Gly Asn Ser Thr Arg Asn Val Met		
1295	1300	1305
Tyr Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ile Lys Glu Asn Gln		
1310	1315	1320
Phe Asp Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Ile Ser Pro Thr		
1325	1330	1335
Arg Ala Tyr Asn Arg Pro Thr Leu Arg Leu Glu Leu Gln Gly Cys		
1340	1345	1350
Glu Val Asn Gly Cys Ser Thr Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Lys		
1355	1360	1365
Ile Glu Asn Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Phe Lys Lys Ser Trp		
1370	1375	1380
Trp Gly Asp Tyr Trp Glu Pro Phe Arg Ala Arg Leu Asn Ala Gln		
1385	1390	1395
Gly Arg Val Asn Ala Trp Gln Ala Lys Ala Asn Asn Asn Lys Gln		
1400	1405	1410
Trp Leu Glu Ile Asp Leu Leu Lys Ile Lys Lys Ile Thr Ala Ile		
1415	1420	1425
Ile Thr Gln Gly Cys Lys Ser Leu Ser Ser Glu Met Tyr Val Lys		

1430 1435 1440
 Ser Tyr Thr Ile His Tyr Ser Glu Gln Gly Val Glu Trp Lys Pro
 1445 1450 1455
 Tyr Arg Leu Lys Ser Ser Met Val Asp Lys Ile Phe Glu Gly Asn
 1460 1465 1470
 Thr Asn Thr Lys Gly His Val Lys Asn Phe Phe Asn Pro Pro Ile
 1475 1480 1485
 Ile Ser Arg Phe Ile Arg Val Ile Pro Lys Thr Trp Asn Gln Ala

1490 1495 1500
 Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Phe Gly Cys Asp Ile Tyr
 1505 1510 1515

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile

370 375 380
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405
 <210> 3
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 3
 Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20 25 30
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35 40 45
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50 55 60

 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65 70 75 80
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85 90 95
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115 120 125

 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130 135 140
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145 150 155 160
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165 170 175

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190

Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205

Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240

Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255

Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270

Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300

Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320

Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335

Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350

Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380

Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400

Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415

Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly

420 425 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435 440 445

Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460

Phe Pro

465

<210> 4

<211> 1516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> super FVa

<400> 4

Ala Gln Leu Arg Gln Phe Tyr Val Ala Ala Gln Gly Ile Ser Trp Ser
1 5 10 15

Tyr Arg Pro Glu Pro Thr Asn Ser Ser Leu Asn Leu Ser Val Thr Ser
20 25 30

Phe Lys Lys Ile Val Tyr Arg Glu Tyr Glu Pro Tyr Phe Lys Lys Glu
35 40 45

Lys Pro Gln Ser Thr Ile Ser Gly Leu Leu Gly Pro Thr Leu Tyr Ala
50 55 60

Glu Val Gly Asp Ile Ile Lys Val His Phe Lys Asn Lys Ala Asp Lys
65 70 75 80

Pro Leu Ser Ile His Pro Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Lys Leu Ser Glu
85 90 95

Gly Ala Ser Tyr Leu Asp His Thr Phe Pro Ala Glu Lys Met Asp Asp
100 105 110

Ala Val Ala Pro Gly Arg Glu Tyr Thr Tyr Glu Trp Ser Ile Ser Glu
115 120 125

Asp Ser Gly Pro Thr His Asp Asp Pro Pro Cys Leu Thr His Ile Tyr
130 135 140

Tyr Ser His Glu Asn Leu Ile Glu Asp Phe Asn Ser Gly Leu Ile Gly

145 150 155 160
 Pro Leu Leu Ile Cys Lys Lys Gly Thr Leu Thr Glu Gly Gly Thr Gln
 165 170 175
 Lys Thr Phe Asp Lys Gln Ile Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
 180 185 190
 Ser Lys Ser Trp Ser Gln Ser Ser Ser Leu Met Tyr Thr Val Asn Gly
 195 200 205
 Tyr Val Asn Gly Thr Met Pro Asp Ile Thr Val Cys Ala His Asp His
 210 215 220

 Ile Ser Trp His Leu Leu Gly Met Ser Ser Gly Pro Glu Leu Phe Ser
 225 230 235 240
 Ile His Phe Asn Gly Gln Val Leu Glu Gln Asn His His Lys Val Ser
 245 250 255
 Ala Ile Thr Leu Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Ala Asn Met Thr Val
 260 265 270
 Gly Pro Glu Gly Lys Trp Ile Ile Ser Ser Leu Thr Pro Lys His Leu
 275 280 285

 Gln Ala Gly Met Gln Ala Tyr Ile Asp Ile Lys Asn Cys Pro Lys Lys
 290 295 300
 Thr Gln Asn Leu Lys Lys Ile Thr Arg Glu Gln Arg Arg His Met Lys
 305 310 315 320
 Arg Trp Glu Tyr Phe Ile Ala Ala Glu Glu Val Ile Trp Asp Tyr Ala
 325 330 335
 Pro Val Ile Pro Ala Asn Met Asp Lys Lys Tyr Arg Ser Gln His Leu
 340 345 350

 Asp Asn Phe Ser Asn Gln Ile Gly Lys His Tyr Lys Lys Val Met Tyr
 355 360 365
 Thr Gln Tyr Glu Asp Glu Ser Phe Thr Lys His Thr Val Asn Pro Asn
 370 375 380
 Met Lys Glu Asp Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Gln Val Arg
 385 390 395 400

Asp Thr Leu Lys Ile Val Phe Lys Asn Met Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
405 410 415

Ile Tyr Pro His Gly Val Thr Phe Ser Pro Tyr Glu Asp Glu Val Asn
420 425 430

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Asn Asn Thr Met Ile Arg Ala Val Gln
435 440 445

Pro Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Lys Trp Asn Ile Leu Glu Phe Asp Glu
450 455 460

Pro Thr Glu Asn Asp Ala Gln Cys Leu Thr Arg Pro Tyr Tyr Ser Asp
465 470 475 480

Val Asp Ile Met Arg Asp Ile Ala Ser Gly Leu Ile Gly Leu Leu Leu
485 490 495

Ile Cys Lys Ser Arg Ser Leu Asp Arg Gln Gly Ile Gln Arg Ala Ala
500 505 510

Asp Ile Glu Gln Gln Ala Val Phe Ala Val Phe Asp Glu Asn Lys Ser
515 520 525

Trp Tyr Leu Glu Asp Asn Ile Asn Lys Phe Cys Glu Asn Pro Asp Glu
530 535 540

Val Lys Arg Asp Asp Pro Lys Phe Tyr Glu Ser Asn Ile Met Ser Thr
545 550 555 560

Ile Asn Gly Tyr Val Pro Glu Ser Ile Thr Thr Leu Gly Phe Cys Phe
565 570 575

Asp Asp Thr Val Gln Trp His Phe Cys Ser Val Gly Thr Gln Asn Glu
580 585 590

Ile Leu Thr Ile His Phe Thr Gly His Ser Phe Ile Tyr Gly Lys Arg
595 600 605

Cys Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Met Arg Gly Glu Ser Val Thr
610 615 620

Val Thr Met Asp Asn Val Gly Thr Trp Met Leu Thr Ser Met Asn Ser
625 630 635 640

Ser Pro Arg Ser Lys Lys Leu Arg Leu Lys Phe Arg Asp Val Lys Cys

645 650 655
 Ile Pro Asp Asp Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Ile Phe Glu Pro Pro Glu
 660 665 670

 Ser Thr Val Met Ala Thr Gln Lys Met His Asp Arg Leu Glu Pro Glu
 675 680 685
 Asp Glu Glu Ser Asp Ala Asp Tyr Asp Tyr Gln Asn Arg Leu Ala Ala
 690 695 700
 Ala Leu Gly Ile Arg Ser Phe Arg Asn Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu
 705 710 715 720
 Glu Glu Phe Asn Leu Thr Ala Leu Ala Leu Glu Asn Gly Thr Glu Phe
 725 730 735

 Val Ser Ser Asn Thr Asp Ile Ile Val Gly Ser Asn Tyr Ser Ser Pro
 740 745 750
 Ser Asn Ile Ser Lys Phe Thr Val Asn Asn Leu Ala Glu Pro Gln Lys
 755 760 765
 Ala Pro Ser His Gln Gln Ala Thr Thr Ala Gly Ser Pro Leu Arg His
 770 775 780
 Leu Ile Gly Lys Asn Ser Val Leu Asn Ser Ser Thr Ala Glu His Ser
 785 790 795 800

 Ser Pro Tyr Ser Glu Asp Pro Ile Glu Asp Pro Thr Asp Tyr Ile Glu
 805 810 815
 Ile Ile Pro Lys Glu Glu Val Gln Ser Ser Glu Asp Asp Tyr Ala Glu
 820 825 830
 Ile Asp Tyr Val Pro Tyr Asp Asp Pro Tyr Lys Thr Asp Val Arg Thr
 835 840 845
 Asn Ile Asn Ser Ser Arg Asp Pro Asp Asn Ile Ala Ala Trp Tyr Leu
 850 855 860

 Arg Ser Asn Asn Gly Asn Arg Arg Asn Tyr Tyr Ile Ala Ala Glu Glu
 865 870 875 880
 Ile Ser Trp Asp Tyr Ser Glu Phe Val Gln Arg Glu Thr Asp Ile Glu
 885 890 895

Asp Ser Asp Asp Ile Pro Glu Asp Thr Thr Tyr Lys Lys Val Val Phe
900 905 910

Arg Lys Tyr Leu Asp Ser Thr Phe Thr Lys Arg Asp Pro Arg Gly Glu
915 920 925

Tyr Glu Glu His Leu Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Glu Val
930 935 940

Asp Asp Val Ile Gln Val Arg Phe Lys Asn Leu Ala Ser Arg Pro Tyr
945 950 955 960

Ser Leu His Ala His Gly Leu Ser Tyr Glu Lys Ser Ser Glu Gly Lys
965 970 975

Thr Tyr Glu Asp Asp Ser Pro Glu Trp Phe Lys Glu Asp Asn Ala Val
980 985 990

Gln Pro Asn Ser Ser Tyr Thr Tyr Val Trp His Ala Thr Glu Arg Ser
995 1000 1005

Gly Pro Cys Ser Pro Gly Ser Ala Cys Arg Ala Trp Ala Tyr Tyr
1010 1015 1020

Ser Ala Val Asn Pro Glu Lys Asp Ile His Ser Gly Leu Ile Gly
1025 1030 1035

Pro Leu Leu Ile Cys Gln Lys Gly Ile Leu His Lys Asp Ser Asn
1040 1045 1050

Met Pro Val Asp Met Arg Glu Phe Val Leu Leu Phe Met Thr Phe
1055 1060 1065

Asp Glu Lys Lys Ser Trp Tyr Tyr Glu Lys Lys Ser Arg Ser Ser
1070 1075 1080

Trp Arg Leu Thr Ser Ser Glu Met Lys Lys Ser His Glu Phe His
1085 1090 1095

Ala Ile Asn Gly Met Ile Tyr Ser Leu Pro Gly Leu Lys Met Tyr
1100 1105 1110

Glu Gln Glu Trp Val Arg Leu His Leu Leu Asn Ile Gly Gly Ser
1115 1120 1125

Gln Asp Ile His Val Val His Phe His Gly Gln Thr Leu Leu Glu

1130	1135	1140
Asn Gly Asn Lys Gln His Gln Leu Gly Val Trp Pro Leu Leu Pro		
1145	1150	1155
Gly Ser Phe Lys Thr Leu Glu Met Lys Ala Ser Lys Pro Gly Trp		
1160	1165	1170
Trp Leu Leu Asn Thr Glu Val Gly Glu Asn Gln Arg Ala Gly Met		
1175	1180	1185
Gln Thr Pro Phe Leu Ile Met Asp Arg Asp Cys Arg Met Pro Met		
1190	1195	1200
Gly Leu Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Lys Ala Ser		
1205	1210	1215
Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Glu Pro Arg Leu Ala Arg Leu Asn Asn		
1220	1225	1230
Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu Lys Leu Ala Ala Glu		
1235	1240	1245
Phe Ala Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asp Met Gln Lys Glu Val		
1250	1255	1260
Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala Lys His Tyr Leu Lys		
1265	1270	1275
Ser Cys Tyr Thr Thr Glu Phe Tyr Val Ala Tyr Ser Ser Asn Gln		
1280	1285	1290
Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Gly Asn Ser Thr Arg Asn Val Met		
1295	1300	1305
Tyr Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ile Lys Glu Asn Gln		
1310	1315	1320
Phe Asp Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Ile Ser Pro Thr		
1325	1330	1335
Arg Ala Tyr Asn Arg Pro Thr Leu Arg Leu Glu Leu Gln Gly Cys		
1340	1345	1350
Glu Val Asn Gly Cys Ser Thr Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Lys		
1355	1360	1365

Ile Glu Asn Lys Gln Ile Thr	Ala Ser Ser Phe Lys	Lys Ser Trp
1370	1375	1380
Trp Gly Asp Tyr Trp Glu Pro	Phe Arg Ala Arg Leu	Asn Ala Gln
1385	1390	1395
Gly Arg Val Asn Ala Trp Gln	Ala Lys Ala Asn Asn	Asn Lys Gln
1400	1405	1410
Trp Leu Glu Ile Asp Leu Leu	Lys Ile Lys Lys Ile	Thr Ala Ile
1415	1420	1425
Ile Thr Gln Gly Cys Lys Ser	Leu Ser Ser Glu Met	Tyr Val Lys
1430	1435	1440
Ser Tyr Thr Ile His Tyr Ser	Glu Gln Gly Val Glu	Trp Lys Pro
1445	1450	1455
Tyr Arg Leu Lys Ser Ser Met	Val Asp Lys Ile Phe	Glu Gly Asn
1460	1465	1470
Thr Asn Thr Lys Gly His Val	Lys Asn Phe Phe Asn	Pro Pro Ile
1475	1480	1485
Ile Ser Arg Phe Ile Arg Val	Ile Pro Lys Thr Trp	Asn Gln Ala
1490	1495	1500
Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu	Phe Gly Cys Asp Ile	Tyr
1505	1510	1515