



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0103205  
(43) 공개일자 2015년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/5377 (2006.01) A61K 31/437 (2006.01)  
A61K 38/48 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)  
A61K 31/5377 (2013.01)  
A61K 31/437 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-7020717  
(22) 출원일자(국제) 2014년01월23일  
심사청구일자 2015년07월30일  
(85) 번역문제출일자 2015년07월30일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/058494  
(87) 국제공개번호 WO 2014/118677  
국제공개일자 2014년08월07일  
(30) 우선권주장  
61/759,332 2013년01월31일 미국(US)

(71) 출원인  
화이자 인코포레이티드  
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트  
235  
더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아  
미국 펜실베이니아주 19104-4318 필라델피아 34 앤  
드 시빅 센터 볼레바드  
(72) 발명자  
카미어 로드니  
미국 뉴저지주 08081 시클러빌 세렌 레인 22  
프루비스 조아힘  
미국 매사추세츠주 01730 베드포드 로빈슨 드라이브 1  
피트맨 데브라 디  
미국 뉴햄프셔주 03087 윈드햄 노스 쇼어 로드 20  
(74) 대리인  
제일특허법인

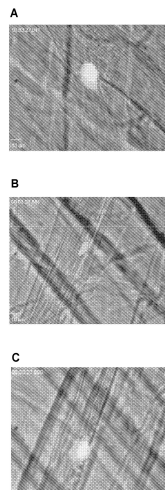
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 인자 Xa 억제제 길항하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 활성화된 인자 X(FXa)의 변이체를 투여함으로써 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 길항하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도13



- (52) CPC특허분류(Coo. Cl.)  
*A61K 38/4846* (2013.01)  
*A61K 9/0019* (2013.01)
-

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 직접적인 인자 Xa 억제제로 치료받는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하는 방법.

### 청구항 2

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를 리바록사반(rivaroxaban) 또는 아픽사반(apixaban)으로 치료받는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하는 방법.

### 청구항 3

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 직접적인 인자 Xa 억제제로 치료받는 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하기 위한 약학 조성물.

### 청구항 4

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 리바록사반 또는 아픽사반으로 치료받는 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하기 위한 약학 조성물.

### 청구항 5

직접적인 인자 Xa 억제제로 치료받는 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서,

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체의 용도.

### 청구항 6

리바록사반 또는 아픽사반으로 치료받는 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서, 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체의 용도.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100%의 출혈 감소가 있는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

### 청구항 8

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를, 직접적인 인자 Xa 억제제의

존재 하에서 생성된 트롬빈의 양의 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시키는 방법.

#### 청구항 9

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를, 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양의 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시키는 방법.

#### 청구항 10

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양의 증가를 필요로 하는 대상체에서 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시키기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 11

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양의 증가를 필요로 하는 대상체에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시키기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 12

리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시키기 위한 약제의 제조에 있어서,

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체의 용도.

#### 청구항 13

직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시키기 위한 약제의 제조에 있어서, 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체의 용도.

#### 청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

생성된 트롬빈의 양이 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배 또는 50배 증가하는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 15

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를, 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 응고 시간의 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 응고 시간을 감소시키는 방법.

#### 청구항 16

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를, 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 응고 시간의 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 리바룩사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 응고 시간을 감소시키는 방법.

#### 청구항 17

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 응고 시간의 감소를 필요로 하는 대상체에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 응고 시간을 감소시키기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 18

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 리바록사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 응고 시간의 감소를 필요로 하는 대상체에서 리바록사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 응고 시간을 감소시키기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 19

직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 응고 시간의 감소를 필요로 하는 대상체에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 존재 하에서 응고 시간을 감소시키기 위한 약제의 제조에 있어서,

- a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및
- b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체의 용도.

#### 청구항 20

리바록사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 응고 시간의 감소를 필요로 하는 대상체에서 리바록사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 응고 시간을 감소시키기 위한 약제의 제조에 있어서, 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체의 용도.

#### 청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100%의 응고 시간 감소가 있는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 22

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

응고 시간 감소가 프로트롬빈 시간(PT)을 이용함으로써 측정되는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 23

제22항에 있어서,

대상체에서 PT가 약 25초, 24초, 23초, 22초, 21초, 20초, 19초, 18초, 17초, 16초, 15초, 14초, 13초, 12초, 11초 또는 10초인, 방법.

#### 청구항 24

제22항에 있어서,

대상체에서 국제 정상화 비(INR)가 약 4.0, 3.9, 3.8, 3.7, 3.6, 3.5, 3.4, 3.3, 3.2, 3.1, 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 2.6, 2.5, 2.4, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8 또는 0.7인, 방법.

#### 청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

PT가 FXa 변이체의 투여 후 15분, 20분, 30분, 40분, 45분, 50분, 60분, 75분 또는 90분에서 측정되는, 방법.

#### 청구항 26

a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및

b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하되, 상기 인자 Xa 변이체가 직접적인 인자 Xa 억제제의 혈장 농도보다 100배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 효과를 길항하는, 약학 조성물.

#### 청구항 27

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를 포함하되, 상기 인자 Xa 변이체가 리바록사반 또는 아픽사반의 혈장 농도보다 100배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 리바록사반 또는 아픽사반의 효과를 길항하는, 약학 조성물.

#### 청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

인자 Xa 변이체가 직접적인 인자 Xa 억제제의 혈장 농도보다 100배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 효과를 길항하는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

인자 Xa 변이체가 계획된 수술 전, 손상 후, 또는 직접적인 인자 Xa 억제제 과다복용 후 투여되는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

인자 Xa 변이체가 1회 초과와 빈도로 투여되는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 추가 전구응고제가 투여되는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 32

제30항에 있어서,

전구응고제가 상이한 인자 Xa 변이체, 인자 IX, 인자 XIa, 인자 XIIa, 인자 VIII, 인자 VIIa, FEIBA 및 프로트롬빈 복합체 농축물(PCC)로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도가 치료 양 초과와 양(supratherapeutic amount)인, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

직접적인 FXa 억제제가 리바록사반이고, 리바록사반의 혈장 농도가 적어도 약 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM 또는 800 nM인, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

직접적인 FXa 억제제가 아픽사반이고, 아픽사반의 혈장 농도가 적어도 약 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM 또는 400 nM인, 방법, 약학 조성물 또는 용도.

#### 청구항 36

a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및

b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를, 급성 대출혈을 갖는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득한 응고병증의 긴급한 역전을 달성하는 방법.

#### 청구항 37

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를, 급성 대출혈을 갖는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득한 응고병증의 긴급한 역전을 달성하는 방법.

#### 청구항 38

a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및

b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 급성 대출혈을 갖는 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득한 응고병증의 긴급한 역전을 달성하기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 39

서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체를 포함하는, 급성 대출혈을 갖는 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득한 응고병증의 긴급한 역전을 달성하기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 40

급성 대출혈을 갖는 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득한 응고병증의 긴급한 역전을 달성하기 위한 약제의 제조에 있어서,

a) 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly으로 치환되는 변형; 및

b) 서열번호 1에서 236에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu, Ala 또는 Gly으로 치환되는 변형

으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체의 용도.

#### 청구항 41

급성 대출혈을 갖는 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득한 응고병증의 긴급한 역전을 달성하기 위한 약제의 제조에 있어서, 서열번호 1에서 235에 상응하는 위치에서 아미노산이 Leu 또는 Thr으로 치환되는 인자 Xa 변이체의 용도.

## 명세서

### 배경 기술

- [0001] 본원은 2013년 1월 31일자로 출원된 미국 가출원 제61/759,332호(이의 내용은 전체로서 본원에 참고로 도입됨)를 우선권 주장한다.
- [0002] 37 CFR § 1.821 하에서 파일명 PC072006\_SEQLIST\_ST25.txt로서 EFS-웹을 통해 컴퓨터 판독가능한 형태(CRF)로 본원과 동시에 제출된 서열목록은 본원에 참고로 도입된다. 상기 서열목록의 전자 사본은 7 킬로바이트의 파일 크기로 2013년 12월 18일에 생성되었다.
- [0003] 약리학적 항응고는 전구혈전 질환을 갖는 환자를 위한 치료의 핵심이다. 50년 이상 동안, 사용가능한 유일한 경구 항응고제는 산화된 비타민 K를 재활용하는 비타민 K 에폭사이드 리덕타제(reductase)(VKOR)의 억제제인 와파린(warfarin)이었다. 와파린은 응고 파라미터의 빈번한 모니터링 및 용량 조절을 필요로 하는 예측불가능한 약동학을 비롯한 많은 단점을 갖는다. 그러나, 응급 출혈의 경우 또는 긴급 수술을 필요로 하는 경우, 빠르고 완전한 역전을 허용하는 해독제가 존재한다.
- [0004] 직접적인 경구 FXa 억제제들은 표준 치료, 예컨대, 와파린과 비교될 때 전구혈전 질환을 갖는 환자에서 투약법 및 지혈 모니터링을 단순화할 잠재력을 갖는 신생 항응고제이다. 이 약물들이 와파린에 비해 많은 장점을 갖지만, 이 신규 항응고제들에 대한 완전히 효과적인 역전제는 입수가가능하지 않다.
- [0005] 그러나, 이들의 효과에 대한 구체적인 대책의 결여는 관리불가능한 출혈의 두려움으로 인해 이 물질들의 광범위한 채택을 제한할 수 있는 충족되지 않은 중대한 임상 요구이다.

### 발명의 내용

- [0006] 본 발명자들은 직접적인 활성화된 인자 X(FXa) 억제제의 효과를 길항하기 위한 조성물 및 방법을 제공함으로써 이러한 충족되지 않는 중대한 임상 요구를 해결하였다.
- [0007] 일부 실시양태에 따라, 본 개시내용은 위치 16(카이모트립신 넘버링 시스템의 사용)에서 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly에 의한 야생형 아미노산의 치환, 또는 위치 17(카이모트립신 넘버링 시스템의 사용)에서 Leu, Ala 또는 Gly에 의한 야생형 아미노산의 치환을 포함하는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는 조성물을 투여함으로써 직접적인 인자 Xa(FXa) 억제제로 치료받는 대상체에서 출혈을 감소시키거나 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 포함하는 조성물을 사용한 치료는 출혈을 50% 이상 감소시킨다. 일부 실시양태에 따라, 직접적인 인자 Xa 억제제는 리바록사반(rivaroxaban) 또는 아픽사반(apixaban)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도는 전형적인 치료 양, 또는 치료 양 초과(의)의 양(supratherapeutic amount)이다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 리바록사반의 혈장 농도는 약 500 nM 이상일 수 있고, 아픽사반의 혈장 농도는 약 250 nM 이상일 수 있다. 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체는 치환 I16L을 함유한다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체는 인자 Xa 억제제의 혈장 농도보다 100배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 효과를 길항할 수 있다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 포함하는 조성물은 계획된 수술 전, 손상 후, 또는 직접적인 FXa 억제제의 의도적 또는 우발적 과다복용 후 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 지혈은 제1 용량의 FXa 변이체의 투여 후 지혈 분석을 이용함으로써 모니터링되고, 적절한 지혈이 예정된 시간까지 달성되지 않는 경우, 하나 이상의 제2 용량의 FXa 변이체를 투여하여 충분한 지혈을 달성한다. 일부 실시양태에 따라, 예정된 시간은 제1 용량의 FXa 변이체가 투여된 후 약 15분, 30분, 45분 또는 60분이다. 다른 시간도 가능하다. 일부 다른 실시양태에서, FXa 변이체 이외에 예를 들면, 상이한 FXa 변이체, 인자 IX, 인자 XIa, 인자 XIIa, 인자 VIII, 인자 VIIa, FEIBA 또는 프로트롬빈 복합체 농축물(PCC)을 비롯한 하나 이상의 제2 전구응고제가 투여된다.
- [0008] 일부 실시양태에 따라, 본 개시내용은 위치 16(카이모트립신 넘버링 시스템의 사용)에서 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly에 의한 야생형 아미노산의 치환, 또는 위치 17(카이모트립신 넘버링 시스템의 사용)에서 Leu, Ala 또는 Gly에 의한 야생형 아미노산의 치환을 포함하는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는 조성물을 투여함으로써 직접적인 인자 Xa(FXa) 억제제로 치료받는 대상체에서 외인성 또는 내인성 응고 경로의 활성화에 반응하여 생성된 트롬빈의 양을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에 따라, 직접적인 인자 Xa 억제제는 리바록사반 또는 아픽사반을 포함한다. 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도는 전형



적인 치료 양, 또는 치료 양 초과 양이다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 리바록사반의 혈장 농도는 약 500 nM 이상일 수 있고, 아픽사반의 혈장 농도는 약 250 nM 이상일 수 있다. 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체는 치환 I16L을 함유한다. 일부 실시양태에 따라, 생성된 트롬빈의 양은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150% 또는 200% 이상만큼 증가한다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체는 인자 Xa 억제제의 혈장 농도보다 100배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 효과를 길항할 수 있다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 포함하는 조성물은 계획된 수술 전, 손상 후, 또는 직접적인 FXa 억제제의 의도적 또는 우발적 과다복용 후 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 지혈은 제1 용량의 FXa 변이체의 투여 후 지혈 분석을 이용함으로써 모니터링되고, 적절한 지혈이 예정된 시간까지 달성되지 않는 경우, 하나 이상의 제2 용량의 FXa 변이체를 투여하여 충분한 지혈을 달성한다. 일부 실시양태에 따라, 예정된 시간은 제1 용량의 FXa 변이체가 투여된 후 약 15분, 30분, 45분 또는 60분이다. 다른 시간도 가능하다. 일부 다른 실시양태에서, FXa 변이체 이외에 예를 들면, 상이한 FXa 변이체, 인자 IX, 인자 XIa, 인자 XIIa, 인자 VIII, 인자 VIIa, FEIBA 또는 프로트롬빈 복합체 농축물(PCC)을 비롯한 하나 이상의 제2 전구응고제가 투여된다.

[0009]

일부 실시양태에 따라, 본 개시내용은 위치 16(카이모트립신 넘버링 시스템의 사용)에서 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly에 의한 야생형 아미노산의 치환, 또는 위치 17(카이모트립신 넘버링 시스템의 사용)에서 Leu, Ala 또는 Gly에 의한 야생형 아미노산의 치환을 포함하는 하나 이상의 변형을 함유하는 인자 Xa 변이체를 포함하는 조성물을 투여함으로써 직접적인 인자 Xa(FXa) 억제제로 치료받는 대상체에서 (예를 들면, PT 또는 INR, 또는 일부 다른 분석을 이용함으로써 측정된) 응고 시간을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에 따라, 직접적인 인자 Xa 억제제는 리바록사반 또는 아픽사반을 포함한다. 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도는 전형적인 치료 양, 또는 치료 양 초과 양이다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 리바록사반의 혈장 농도는 약 500 nM 이상일 수 있고, 아픽사반의 혈장 농도는 약 250 nM 이상일 수 있다. 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체는 치환 I16L을 함유한다. 일부 실시양태에 따라, 응고 시간은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상만큼 감소된다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체는 인자 Xa 억제제의 혈장 농도보다 100배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 인자 Xa 억제제의 효과를 길항할 수 있다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 포함하는 조성물은 계획된 수술 전, 손상 후, 또는 직접적인 FXa 억제제의 의도적 또는 우발적 과다복용 후 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 지혈은 제1 용량의 FXa 변이체의 투여 후 지혈 분석을 이용함으로써 모니터링되고, 적절한 지혈이 예정된 시간까지 달성되지 않는 경우, 하나 이상의 제2 용량의 FXa 변이체를 투여하여 충분한 지혈을 달성한다. 일부 실시양태에 따라, 예정된 시간은 제1 용량의 FXa 변이체가 투여된 후 약 15분, 30분, 45분 또는 60분이다. 다른 시간도 가능하다. 일부 다른 실시양태에서, FXa 변이체 이외에 예를 들면, 상이한 FXa 변이체, 인자 IX, 인자 XIa, 인자 XIIa, 인자 VIII, 인자 VIIa, FEIBA 또는 프로트롬빈 복합체 농축물(PCC)을 비롯한 하나 이상의 제2 전구응고제가 투여된다.

## 도면의 간단한 설명

[0010]

도 1a 및 1b는 리바록사반에 의한 자유 야생형(wt)-FXa 또는 FXa<sup>I16L</sup>의 억제를 보여준다. 야생형-FXa(2 nM)(도 1a) 또는 FXa<sup>I16L</sup>(6 nM)(도 1b)에 의한 펩티딜 기질(SpecXa; 200 μM) 가수분해의 초기 속도를 증가하는 농도의 리바록사반에서 측정하였다. K<sub>i</sub> 값이 각각의 그래프 상에 제시되어 있다.

도 2a 및 2b는 프로트롬비나제(prothrombinase)로 조립된 야생형-FXa 또는 FXa<sup>I16L</sup>의 리바록사반 억제를 보여준다. PCPS(20 μM) 및 FVa(40 nM)의 존재 하에서 야생형-FXa(2 nM)(도 2a) 또는 FXa<sup>I16L</sup>(6 nM)(도 2b)에 의한 펩티딜 기질(SpecXa; 200 μM) 가수분해의 초기 속도를 증가하는 농도의 리바록사반에서 측정하였다.

도 3은 리바록사반의 트롬빈 생성에 대한 효과를 역전시키는 것에 대한 상이한 농도의 FXa<sup>I16L</sup>의 효과를 보여준다.

도 4a 내지 4d는 리바록사반의 효과를 역전시키는 것에 대한 FXa<sup>I16L</sup>의 효과를 보여준다. 정상 인간 혈장을 증가하는 농도의 FXa<sup>I16L</sup>의 부재 또는 존재 하에서 500 nM 리바록사반과 함께 항온처리하였다. 데이터 분석 후, 피크 트롬빈(도 4a 및 4c) 및 생성된 총 트롬빈(ETP; 도 4b 및 4d)을 작도하였다.

도 5a 및 5b는 FXa<sup>I16L</sup>이 고용량 리바록사반의 효과를 역전시킨다는 것을 보여준다. 정상 인간 혈장을 증가하는

농도의 FXa<sup>116L</sup>의 부재 또는 존재 하에서 7.5  $\mu$ M 리바록사반과 함께 항온처리하였다. 데이터 분석 후, 피크 트롬빈(도 5a) 및 생성된 총 트롬빈(ETP; 도 5b)을 작도하였다.

도 6a 및 6b는 FXa<sup>116L</sup> 또는 FXa<sup>116T</sup>가 250 nM 아픽사반의 효과를 역전시킨다는 것을 보여준다. 정상 인간 혈장을 증가하는 농도의 FXa<sup>116L</sup> 또는 FXa<sup>116T</sup>의 부재 또는 존재 하에서 250 nM 아픽사반과 함께 항온처리하였다. 데이터 분석 후, 피크 트롬빈(도 6a) 및 생성된 총 트롬빈(ETP; 도 6b)을 작도하였다.

도 7a 및 7b는 FXa<sup>116L</sup> 또는 FXa<sup>116T</sup>가 고용량 아픽사반의 효과를 역전시킨다는 것을 보여준다. 정상 인간 혈장을 증가하는 농도의 FXa<sup>116L</sup> 또는 FXa<sup>116T</sup>의 부재 또는 존재 하에서 2.0  $\mu$ M 아픽사반과 함께 항온처리하였다. 데이터 분석 후, 피크 트롬빈(도 7a) 및 생성된 총 트롬빈(ETP; 도 7b)을 작도하였다.

도 8a 및 8b는 FXa<sup>116L</sup>이 리바록사반의 존재 하에서 전혈 응고를 바로잡는다는 것을 보여준다. 전혈 혈전탄성촬영(thromboelastography)을 이용하여 전형적인 용량(도 8a) 및 고용량(도 8b)에서 리바록사반의 효과를 역전시키는 FXa<sup>116L</sup>의 능력을 평가하였다.

도 9a 및 9b는 FXa<sup>116L</sup>이 아픽사반의 존재 하에서 전혈 응고를 바로잡는다는 것을 보여준다. 전혈 혈전탄성촬영을 이용하여 전형적인 용량(도 9a) 및 고용량(도 9b)에서 아픽사반의 효과를 역전시키는 FXa<sup>116L</sup>의 능력을 평가하였다.

도 10a 및 10b는 트롬빈 생성 분석에서 FXa<sup>116L</sup>이 리바록사반을 길항한다는 것을 보여준다. 도 10a는 리바록사반의 용량 반응을 보여주고, 도 10b는 리바록사반의 존재 하에서 FXa<sup>116L</sup>의 용량 반응을 보여준다.

도 11은 FXa<sup>116L</sup>이 마우스 꼬리 절단 출혈 모델에서 FXa<sup>116L</sup>이 리바록사반을 길항한다는 것을 보여준다.

도 12는 마우스에게 투여된 리바록사반이 ROTEM을 이용함으로써 측정된 전혈의 응고 시간을 지연시키고 FXa<sup>116L</sup>을 사용한 투여가 리바록사반의 효과를 용량 반응적으로 길항한다는 것을 입증한다.

도 13은 마우스에게 투여된 리바록사반이 레이저에 의해 야기된 고환거근의 혈관 손상 부위에서 응괴 형성을 방해하고 FXa<sup>116L</sup>을 사용한 투여가 리바록사반의 효과를 길항한다는 것을 보여준다. 생체 현미경 관찰, 및 피브린 및 혈소판에 대한 형광 표지된 항체들을 사용하여 응괴 형성을 가시화하였다. 도 13A는 비처리된 마우스에서의 응괴 형성을 보여준다. 도 13B는 리바록사반이 혈소판 축적을 지연시키고 감소시켰고, 피브린 침착을 방해하였다는 것을 보여준다. 대조적으로, 도 13C는 리바록사반 및 FXa<sup>116L</sup>을 투여받은 마우스에서 응괴 형성이 손상 부위에서 일어났다는 것을 보여준다.

도 14는 야생형 인간 인자 X 전구단백질의 아미노산 서열(서열번호 1)이다. 신호 펩티드는 아미노산 1 내지 23에 상응한다. 전구펩티드는 아미노산 24 내지 40에 상응한다. 활성화된 인자 X(FXa)의 성숙 경로는 아미노산 41 내지 179에 상응한다. (활성화 펩티드의 제거 후) 활성화된 FXa의 성숙 중쇄는 아미노산 235 내지 488에 상응한다. 활성화 펩티드(AP)는 아미노산 183 내지 234에 상응한다.

도 15는 야생형 인간 인자 X 전구단백질을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 2)이다. 상기 코딩 서열은 뉴클레오타이드 58 내지 1524에 상응한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

본 개시내용은 직접적인 FXa 억제제의 항응고 효과의 길항을 필요로 하는 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 항응고 효과를 길항하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명자들은 일부 FXa 변이체들이 직접적인 FXa 억제제의 효과를 용량 의존적 방식으로 빠르고 완전하게 길항한다는 것을 발견하였다. 보다 구체적으로, 본 발명자들은 상대적으로 소량의 FXa 변이체가 치료 농도 및 심지어 치료 농도 초과 농도(supratherapeutic concentration)의 FXa 억제제의 존재 하에서 정상적인 생체내 응고 활성을 회복시킨다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명자들의 개시내용은 직접적인 FXa 억제제의 항응고 효과에 대한 빠르고 효과적인 해독제를 제공함으로써 이들 유리한 항응고제의 요건을 충족시키는 데에 기여한다.

- [0012] 응고 인자 X(FX)는 내인성 인자 IX/인자 VIII 또는 외인성 경로(조직 인자/인자 VIIa)에 의한 활성화 시 프로트롬비나제의 프로테아제(protease) 모이어티인 FXa가 되는 자이모겐(zymogen)이다. 활성화 펩티드(AP)를 방출시키는, Arg-Ile 절단가능한 결합의 단백질용해성 절단 후, 자이모겐에서의 일련의 잘 정의된 구조적 변화들은 성숙 활성 세린 프로테아제로의 활성화 과정을 유발한다(전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Toso et al., (2008) J. Biol. Chem. 283, 18627-18635); 문헌(Bunce et al., (2011) Blood 117, 290-298); 및 문헌(Ivanciu et al., (2011) Nat. Biotechnol. 29, 1028-1033) 참조). 성숙 FXa는 경쇄, 및 촉매 도메인을 함유하는 중쇄를 갖는다. 성숙 FXa는 활성화된 보조인자인 인자 Va(FVa)의 결합을 포함하는, 프로트롬비나제 복합체의 형성 시 활성 세린 프로테아제가 된다.
- [0013] 활성화 절단 시 자이모겐-유사 FXa 변이체를 생성하는 FX의 변이체 형태를 개발하였다. 즉, 일단 절단되면, 생성된 FXa 변이체는 보다 약한 활성 부위 기능을 갖고 순환하는 억제제(즉, 항트롬빈 III 및 TFPI)에 의한 불활성화에 대한 보다 높은 내성을 갖는다. 따라서, FXa 변이체는 혈장에서 야생형 FXa보다 더 긴 반감기를 갖는다. FXa 변이체는 FVa, 지질 막 및 칼슘에 결합하여 프로트롬빈을 효율적으로 활성화시키는 전체 활성 프로트롬비나제 복합체를 형성한다.
- [0014] FXa의 자이모겐-유사 변이체는 자이모겐-유사 입체구조로 순환하고 혈전형성성을 나타내지 않는 듯하다(전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Toso et al., (2008) J. Biol. Chem. 283, 18627-18635) 및 문헌(Ivanciu et al., (2011) Nat. Biotechnol. 29, 1028-1033) 참조). 이러한 FXa 변이체의 예는 전체로서 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제W02007/059513호에 기재되어 있다.
- [0015] 응고 효소는 카이모트립신-유사 폴드를 보유하는 프로테아제의 S1 펩티다제(peptidase) 패밀리에 속하는 트립신-유사 효소이다. 응고 프로테아제는 서로에 대해 매우 높은 상동성을 갖고 소화의 선조 세린 프로테아제에 대한 높은 상동성을 갖는 촉매 도메인을 함유한다. 구조적 상동성/동일성은 응고 효소(인자 Xa를 포함함)의 촉매 도메인 내의 잔기들이 카이모트립시노겐 내의 상응하는 잔기에 따라 넘버링될 정도로 매우 높다(70% 초과)(카이모트립신 넘버링 시스템; 전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Bajaj and Birktoft, Methods Enzymol. 1993; 222:96-128, Table 2) 및 문헌(Bode W, Mayr I, Bauman Y, et al. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Trp insertion segment. EMBO J 1989; 8(11):3467-3475) 참조). 따라서, 아미노산은 당업자에게 잘 공지되어 있는 카이모트립신 넘버링 시스템에 따라 본원에서 지칭될 수 있다.
- [0016] 본 개시내용에 따라, FXa 변이체는 이 변이체를 생체내에서 또는 시험관내에서 야생형 FXa 단백질에 비해 더 자이모겐과 유사하게 만드는 아미노산 치환을 포함하는 FXa 단백질일 수 있다. 본 개시내용의 FXa 변이체는 프로트롬비나제의 형성 시 야생형 FXa 활성을 실질적으로 다시 획득한다. 본 개시내용의 방법에서 유용한 FXa 변이체의 예는 하기 변형들로 구성된 군으로부터 선택된 변형을 포함하는 변이체이다: 카이모트립신 넘버링 시스템에 따라, a) 위치 16의 Ile는 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly이고, b) 위치 17의 Val은 Leu, Ala 또는 Gly이다. 카이모트립신 넘버링 시스템에서 아미노산 16 및 17은 서열번호 1(인간 인자 X 전구단백질)의 각각 아미노산 235 및 236에 존재한다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체는 FXa<sup>116L</sup> 및 FXa<sup>116T</sup>이다(FXa 변이체에 대한 본원에서 사용된 명명법은 카이모트립신 넘버링 시스템에 따라 넘버링된 위치에서 원래의 아미노산에 이어서 치환된 아미노산을 언급한다). FXa 변이체는 임의의 포유동물 FXa의 변이체일 수 있다. 그러나, 특히 흥미로운 것은 인간 FXa의 FXa 변이체이다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변이체 FXa로 활성화되는 FX 변이체는 비-천연 세포내 단백질용해성 절단 부위의 삽입에 의해 더 변형될 수 있다. 비-한정적인 예에서, 포유동물 세포에서 "활성화된" 자이모겐-유사 FXa 변이체를 발현하기 위해, 변이체 FX 자이모겐에서 서열번호 1의 위치 234(카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 15)의 Arg와 서열번호 1의 위치 235(카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 16)에 상응하는 위치의 아미노산 사이에 비-천연 세포내 단백질용해성 절단 부위를 삽입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-천연 세포내 프로테아제 절단 부위는 Arg-Lys-Arg 또는 Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg(서열번호 3)이다. 이 절단 부위들은 세포 내에서 프로테아제(PACE/푸린(furin)-유사 효소)에 의해 효율적으로 인식되고 제거된다. 이 절단은 분자의 성숙 중쇄가 서열번호 1의 위치 235(카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 16)에 상응하는 위치의 아미노산에서 시작되는 프로세싱된 변이체 FXa를 발생시킬 수 있다. 상기 위치에서 이 절단 부위의 도입은 FXa로의 FX의 세포내 전환을 허용한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, FX 변이체 활성화 펩티드(AP)의 전체 아미노산 서열(즉, 서열번호 1의 아미노산 183 내지 234)은 비-천연 세포내 프로테아제 절단 부위로 대체된다. 일부 실시양태에 따라, 비-천연 세포내 프로테아제

절단 부위는 Arg-Lys-Arg 또는 Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg(서열번호 3)이다. 상기 설명된 바와 같이, 이 변형은 세포에 의해 발현된 FX 변이체의 세포내 절단을 허용한다. 세포내 절단은 FX 변이체를 활성화된 자이모겐-유사 FXa 변이체로 전환시키고, 상기 활성화된 자이모겐-유사 FXa 변이체는 후속 정제를 위해 세포에 의해 분비된다. 이 방법은 예를 들면, 단백질의 단리 후 또는 혈액 응고 직전에 변이체 응고 인자를 활성화시키기 위해 요구될 세포의 절단에 대한 필요성을 없앤다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 FXa 변이체는 천연 야생형 인간 신호 서열 및/또는 전구펩티드 서열을 포함하는 FX 변이체 전구단백질로부터 유도된다. 다른 실시양태에서, 비-인간 종으로부터의 FX 신호 서열 및/또는 전구펩티드는 상응하는 천연 아미노산 서열 대신에 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 다른 인간 또는 비-인간 분비된 단백질로부터의 신호 서열 및/또는 전구펩티드 서열은 상응하는 천연 아미노산 서열 대신에 사용될 수 있다.

[0020] 예시적인 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 235의 아미노산(야생형 서열에서 이소류신)은 쓰레오닌(Thr), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 아스파르트산(Asp) 및 글리신(Gly)으로 구성된 군으로부터 선택된 상이한 아미노산으로 치환된다. 이 치환들은 각각 명명법 I235T, I235L, I235F, I235D 및 I235G의 이용을 통해 기재될 수 있는데, 이때 첫 번째 문자는 이소류신에 대한 단일 문자 코드이고, 마지막 문자는 야생형 서열 내로 치환되는 아미노산에 대한 단일 문자 코드이다. 서열번호 1의 위치 235가 카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 16에 해당하기 때문에, 상기 치환들은 I16T, I16L, I16F, I16D 및 I16G로 기재될 수 있다. 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 235의 아미노산은 Thr으로 치환된다(즉, I235T 또는 I16T). 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 235의 아미노산은 Leu으로 치환된다(즉, I235L 또는 I16L). 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 235의 아미노산은 Phe으로 치환된다(즉, I235F 또는 I16F). 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 235의 아미노산은 Asp으로 치환된다(즉, I235D 또는 I16D). 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 235의 아미노산은 Gly으로 치환된다(즉, I235G 또는 I16G).

[0021] 또 다른 예시적인 실시양태에 따라, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 236의 아미노산(야생형 서열에서 발린)은 류신(Leu), 알라닌(Ala) 및 글리신(Gly)으로 구성된 군으로부터 선택된 상이한 아미노산으로 치환된다. 이 치환들은 각각 명명법 V236L, V236A 및 V236G의 이용을 통해 기재될 수 있는데, 이때 첫 번째 문자는 발린에 대한 단일 문자 코드이고, 마지막 문자는 야생형 서열 내로 치환되는 아미노산에 대한 단일 문자 코드이다. 서열번호 1의 위치 236이 카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 17에 해당하기 때문에, 상기 치환들은 V17L, V17A 및 V17G로 기재될 수 있다. 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 236의 아미노산은 Leu으로 치환된다(즉, V236L 또는 V17L). 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 236의 아미노산은 Ala으로 치환된다(즉, V236A 또는 V17A). 한 실시양태에서, FXa 변이체는 서열번호 1의 아미노산 41 내지 179 및 아미노산 235 내지 488을 포함하는데, 이때 위치 236의 아미노산은 Gly으로 치환된다(즉, V236G 또는 V17G).

[0022] 다른 실시양태에서, 이전 단락들에 기재된 특정 변이체들을 포함하는 본 개시내용의 FXa 변이체는 단백질의 경쇄 및/또는 성숙 중쇄의 다양한 동형체(isoform)를 포함할 수 있다. FXa 변이체 성숙 중쇄의 비-한정적인 예시적인 동형체는 성숙 중쇄의 알파 버전 및 베타 버전을 포함한다(본원에 참고로 도입되는 문헌(Jesty et al., J Biol Chem. 1975 Jun 25; 250(12):4497-504)). 본 개시내용의 조성물은 FXa 변이체 단백질을 포함할 수 있고, 이때 알파 성숙 중쇄 동형체 및 베타 성숙 중쇄 동형체 중 어느 하나 또는 이들 둘다가 나타난다.

[0023] 다른 실시양태에 따라, 이전 단락들에 기재된 특정 변이체들을 포함하는 FXa 변이체 단백질의 동형체는 변화가 가능한 수의 아미노산(예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 아미노산)이 단백질의 경쇄 및/또는 성숙 중쇄의 카복시 말단으로부터 결실되어 있거나 이러한 카복시 말단에 추가되어 있는 동형체를 포함할 수 있다.

[0024] 일부 실시양태에 따라, 본 개시내용의 FXa 변이체는 서열번호 1의 야생형 FXa의 아미노산 서열과 비교될 때 최소한 어느 정도의 상동성 또는 서열 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 따라서, 예를 들면, FXa 변이체는 서열면에서 서열번호 1의 야생형 FXa 경쇄 및 성숙 중쇄와 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 상



동한 또는 동일한 경쇄 및 성숙 중쇄를 함유하는 단백질을 포함하는데, 이때 이러한 FXa 변이체는 서열번호 1의 위치 235에 상응하는 아미노산 위치에서 Thr, Leu, Phe, Asp 또는 Gly에 의한 치환, 또는 서열번호 1의 위치 236에 상응하는 아미노산 위치에서 Leu, Ala 또는 Gly에 의한 치환도 포함하고, 추가로 이러한 FXa 변이체는 프로트롬비나제 복합체 내로 도입될 때까지 자이모겐성을 갖는다. 서열번호 1의 아미노산 서열에서, 야생형 FXa 경쇄 서열은 아미노산 41 내지 179에 상응하고, 야생형 FXa 성숙 중쇄 서열은 아미노산 235 내지 488에 상응한다. 백분율 아미노산 서열 상동성 또는 동일성은 국립 생물공학정보 센터의 웹사이트 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 입수가 가능한 소프트웨어, 예컨대, 단백질 BLAST의 이용을 통해 용이하게 측정될 수 있다.

[0025] 다른 비-한정적인 실시양태에 따라, 본 개시내용의 FXa 변이체는 하나 이상의 O-연결된 또는 N-연결된 탄수화물기 또는 변화가능한 수의 감마-카복시글루탐산(Gla) 잔기를 포함하나 이들로 한정되지 않는 하나 이상의 번역 후 변형을 함유하는 FXa 변이체도 포함할 수 있다. 본 개시내용의 FXa 변이체는 화학적으로 변형된 FXa 변이체 단백질을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법에서 유용한 다른 FXa 변이체도 가능하다.

[0026] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "FXa<sup>116x</sup>"는 활성화된 인자 X의 변이체를 지칭하는데, 이때 (카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 16에 상응하는) 서열번호 1의 위치 235에 상응하는 아미노산은 야생형 서열의 아미노산(이소류신)으로부터 "x"로 표시된 상이한 아미노산으로 교환된다. 일부 비-한정적인 예시적인 실시양태에서, 아미노산 "x"는 쓰레오닌(Thr 또는 T), 이소류신(Leu 또는 L), 페닐알라닌(Phe 또는 F), 아스파르트산(Asp 또는 D) 또는 글리신(Gly 또는 G)일 수 있다.

[0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "FXa<sup>V17y</sup>"는 활성화된 인자 X의 변이체를 지칭하는데, 이때 (카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 17에 상응하는) 서열번호 1의 위치 236에 상응하는 아미노산은 야생형 서열의 아미노산(발린)으로부터 "y"로 표시된 상이한 아미노산으로 교환된다. 일부 비-한정적인 예시적인 실시양태에서, 아미노산 "y"는 류신(Leu 또는 L), 알라닌(Ala 또는 A) 또는 글리신(Gly 또는 G)일 수 있다.

[0028] 용어 "FXa<sup>116x</sup>" 및 "FXa<sup>V17y</sup>"는 서열번호 1에 기재된 단백질 서열에 의해 한정되지 않는다. 오히려, 이 용어들은 프로트롬비나제 복합체 내로 도입될 때까지 자이모겐으로서 거동하는, 카이모트립신 넘버링 시스템에서 위치 16 또는 17에서 특정 치환 돌연변이를 갖는 본원에 기재된 다양한 동형체들 및 상동성 단백질들을 추가로 포함한다.

[0029] 본 개시내용의 FXa 변이체는 임의의 단백질 발현 기법에 의해 생성될 수 있다.

[0030] "단리된 단백질", "단리된 폴리펩티드" 또는 "단리된 변이체"는 그의 기원 또는 유도 공급원에 의해 (1) 그의 천연 상태에서 그와 함께 동반되는 천연적으로 회합된 성분과 회합되어 있지 않거나, (2) 동일한 종으로부터의 다른 단백질을 갖지 않거나, (3) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나, (4) 자연에서 존재하지 않는 단백질, 폴리펩티드 또는 변이체이다. 따라서, 화학적으로 합성된 폴리펩티드, 또는 그의 천연적 기원이 되는 세포와 상이한 세포 시스템에서 합성된 폴리펩티드는 그의 천연적으로 회합된 성분으로부터 "단리되어" 있을 것이다. 단백질은 당분야에서 잘 공지되어 있는 단백질 정제 기법을 이용한 단리에 의해 천연적으로 회합된 성분을 실질적으로 갖지 않게 될 수도 있다.

[0031] 단백질 또는 폴리펩티드는 샘플의 적어도 약 60% 내지 75%가 단일 종의 폴리펩티드를 나타낼 때 "실질적으로 순수"하거나, "실질적으로 균질"하거나, "실질적으로 정제되어" 있다. 폴리펩티드 또는 단백질은 단량체 또는 다량체일 수 있다. 실질적으로 순수한 폴리펩티드 또는 단백질은 전형적으로 단백질 샘플의 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%(중량/중량), 보다 통상적으로 약 95%를 차지할 것이고, 99% 초과 순도를 가질 수 있다. 단백질 순도 또는 균질도는 당분야에서 잘 공지되어 있는 다수의 수단, 예컨대, 단백질 샘플의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 이어서, 당분야에서 잘 공지되어 있는 염료를 사용한 겔의 염색 시 단일 폴리펩티드 밴드의 가시화에 의해 표시될 수 있다. 일부 목적을 위해, HPLC 또는 당분야에서 잘 공지되어 있는 다른 정제 수단을 이용함으로써 보다 높은 해상도를 제공할 수 있다.

[0032] 본 개시내용의 방법은 직접적인 FXa 억제제를 길항하는 데에 유용하다. 직접적인 FXa 억제제는 FXa에 직접적으로 결합하고 다른 프로테아제들에 비해 FXa에 선택적으로 결합하는 억제제이다. 직접적인 FXa 억제제는 프로트롬빈에 관해서는 FXa의 비-경쟁적 억제제이다. 이 억제제는 기질 결합 홈(cleft)에 결합하고 마찬가지로 이 영역에 결합하는 작은 펩티드 기질에 관해서는 경쟁적으로 FXa를 억제한다. 이 억제제는 높은 피코몰 친화성으로 FXa를 억제하고 혈장에서 고도로 결합되는 단백질이다. 직접적인 FXa 억제제의 예는 리바록사반, 아픽사반, 베

트릭사반(betrixaban), 다렉사반(darexaban), 에독사반(edoxaban) 및 오타믹사반(otamixaban)이다. 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제는 리바록사반 및 아픽사반으로부터 선택된다.

[0033]

본 개시내용에 따라, FXa 변이체는 FXa에 결합하거나 프로트롬비나제를 형성한 FXa에 결합하는 직접적인 FXa 억제제를 길항하는 데에 사용될 수 있다. 직접적인 FXa 억제제는 억제를 위해 FXa의 보조인자를 요구할 수 있거나 요구하지 않을 수 있다. 본 개시내용의 방법에 따라, FXa 변이체, 예컨대, FXa<sup>116L</sup> 및 FXa<sup>116T</sup>는 직접적인 FXa 억제제를 함유하는 혈액을 갖는 대상체에게 투여된다.

[0034]

본 개시내용은 합성 억제제, 소분자 억제제, 경구 사용가능한 억제제 또는 가역적 억제제를 포함하나 이들로 한정되지 않는 직접적인 FXa 억제제를 길항하기 위한 FXa 변이체의 용도를 포괄한다. FXa 억제제는 이들 특징들의 임의의 조합체, 예컨대, 경구 사용가능한 합성 가역적 소분자 억제제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제는 리바록사반, 아픽사반, 베트릭사반, 다렉사반, 에독사반 및 오타믹사반으로부터 선택될 수 있다(문헌(Perzborn et al., Nat Rev Drug Discov. 2011 Jan; 10(1):61-75); 문헌(Turpie, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Jun; 27(6):1238-47); 문헌(Pinto et al., Expert Opin. Ther. Patents 22:645-661 (2012)); 및 문헌(Pinto, et al., J. Med. Chem. 50:5339-5356 (2007))(이들 각각은 본원에 참고로 도입됨) 참조). 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제는 리바록사반 및 아픽사반으로부터 선택된다.

[0035]

일부 실시양태에서, 본 개시내용의 FXa 변이체는 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기 위해 대상체에게 투여될 수 있는데, 이때 이러한 억제제는 치료 농도로 존재한다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 FXa 변이체는 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기 위해 대상체에게 투여될 수 있는데, 이때 이러한 억제제는 치료 농도 초과 농도로 존재한다. 치료 농도 초과 농도는 특정 대상체 또는 대상체 부류에서 항응고를 안전하게 달성하기 위해 요구되는 것으로 통상적으로 간주되는 농도보다 더 높은 농도이다. 직접적인 FXa 억제제의 치료 농도 초과 농도는 우발적인 또는 의도적인 과다복용으로부터 비롯될 수 있다. 직접적인 FXa 억제제의 치료 농도 초과 농도는 특정 대상체에서 예를 들면, 약물 상호작용 또는 다른 인자로 인한 예상외의 효과, 예컨대, 이 약물에 대한 예상외로 높은 민감성 또는 예상외로 느린 제거 속도로부터 비롯될 수도 있다. 특정 대상체 또는 대상체 부류에서 직접적인 FXa 억제제의 치료 농도 또는 치료 농도 초과 농도를 결정하는 것은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 지식 내에 있다.

[0036]

본 개시내용에 따라, FXa 변이체는 다른 트립신-유사 프로테아제에 비해 FXa에 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 10배 이상, 15배 이상, 20배 이상, 25배 이상, 30배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1,000배 이상, 5,000배 이상 또는 10,000배 이상만큼 선택적으로 결합하는 직접적인 FXa 억제제 또는 억제제들을 길항하기 위해 사용된다.

[0037]

직접적인 FXa 억제제는 약  $2 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_i$ 로 FXa 변이체에 결합할 수 있다. " $K_i$ "는 절반 최대 억제를 달성하기 위해 요구되는 농도인, 특정 억제제-표적 상호작용의 억제제 상수를 지칭한다. 당분야에서 공지되어 있는 방법을 이용하여  $K_i$ 를 결정할 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 약  $2 \times 10^{-8}$  M 이하, 약  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 약  $9 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $8 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $7 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $6 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $5 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $4 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $3 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $2 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $1 \times 10^{-9}$  M 이하, 약  $9 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $8 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $7 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $6 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $5 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $4 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $3 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $2 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $1 \times 10^{-10}$  M 이하, 약  $9 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $8 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $7 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $6 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $5 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $4 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $3 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $2 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $1 \times 10^{-11}$  M 이하, 약  $9 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $8 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $7 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $6 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $5 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $4 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $3 \times 10^{-12}$  M 이하, 약  $2 \times 10^{-12}$  M 이하 또는 약  $1 \times 10^{-12}$  M 이하의  $K_i$ 로 프로트롬비나제 복합체로부터 자유로운 FXa 변이체에 결합하는 직접적인 FXa 억제제를 길항하는 것을 고려한다. 본 개시내용의 방법에 따라 FXa 변이체에 의해 길항되는 직접적인 FXa 억제제는 FXa 변이체에 결합하는  $K_i$ 보다 1.5배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 10배 이상, 15배 이상, 20배 이상, 25배 이상, 30배 이상 또는 50배 이상 더 낮은  $K_i$ 로 야생형 FXa에 결합할 수 있다. 직접적인 FXa 억제제는 프로트롬비나제 복합체로부터 자유로운 FXa 변이체에 결합하는  $K_i$ 보다 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상,

60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상 더 낮은  $K_i$ 로 야생형 FXa에 결합할 수 있다. 직접적인 FXa 억제제는 FXa 변이체를 포함하는 프로트롬비나제 복합체에 결합할 때의  $K_i$ 와 거의 동일한  $K_i$ 로 야생형 FXa를 포함하는 프로트롬비나제 복합체에 결합할 수 있다.

[0038] 한 양태에서, 본 개시내용은 FXa 변이체를 투여함으로써 (내부적으로 또는 외부적으로) 출혈이 일어나거나 출혈의 위험(예를 들면, 계획된 수술의 과정)에 있는 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 길항하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제는 치료 농도 또는 보다 더 높은 농도(즉, 치료 농도 초과 농도)로 대상체에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 농도는 민감한 개체에서 과다복용일 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 직접적인 FXa 억제제의 과다복용에 대한 해독제를 제공하는 데에 유용하다. 다양한 실시양태에서, 치료의 대상체는 인간 또는 수의학적 대상체일 수 있다.

[0039] 직접적인 억제제 과다복용은 과도하게 감소된 응고 능력의 증상 또는 징후의 존재에 근거하여 검출될 수 있다. 비-한정적인 예는 어두운 타르색 대변, 혈변 및 혈액의 구토를 포함하는 위장관 출혈의 증거를 포함한다. 다른 예는 코 출혈, 및 타박상 또는 미미한 절개 및 긁힘으로부터의 출혈에 대한 증가된 경향 또는 민감성을 포함한다.

[0040] 임상 환경에서, 직접적인 억제제 과다복용은 직접적으로 검출될 수 있거나, 대상체 혈액이 응고하는 능력을 측정하고 예상된 항응고 정도로부터의 편차를 검출함으로써 검출될 수 있다. 혈액 응고력은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 익숙한 방식으로 측정될 수 있다. 예를 들면, 과다복용은 대상체의 프로트롬빈 시간이 과도하게 연장될 때 의심될 수 있다. 일부 실시양태에서, 과다복용은 국제 정상화 비(INR)로서 표현된 프로트롬빈 시간이 약 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 12, 14, 16, 18 또는 20 이상인 것으로 측정될 때 확인된다.

[0041] FXa 변이체는 계획된 수술 전, 외부 또는 내부 출혈을 초래하는 손상 후, 또는 직접적인 FXa 억제제 과다복용 후를 포함하나 이들로 한정되지 않는, 직접적인 FXa 억제제의 효과를 길항하기를 원할 때마다 투여될 수 있다. 본 개시내용에 따라, FXa 변이체는 원하는 길항 효과가 필요할 때, 예컨대, 계획된 수술 전, 외부 또는 내부 출혈을 초래하는 손상 후 또는 직접적인 FXa 억제제 과다복용 후 약 12시간 이상, 약 6시간 이상, 약 3시간 이상, 약 2시간 이상, 약 1시간 이상, 약 30분 이상, 약 10분 이상 또는 약 5분 이상 후에 투여될 수 있다.

[0042] 또 다른 실시양태에 따라, 본 개시내용은 급성 대출혈을 갖는 FXa 대상체에서 FXa 억제 치료로 인해 획득된 응고병증의 긴급한 역전을 달성하기 위해 FXa 변이체를 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 성인 인간 환자이다. 다른 실시양태에서, 대상체는 소아 인간 환자이다.

[0043] 일부 실시양태에서, 급성 대출혈은 외상에 의해 야기된다. 다른 실시양태에서, 급성 대출혈은 수술 또는 다른 종류의 중재 절차 동안 일어난다. 예시적인 비-한정적인 중재 절차는 절개, 배출, 혈관 수술, 충수절제, 탈장 절개 또는 탈장성형, 복부 수술, 담낭절제, 원형절제(천두공), 요추천자, 심장박동조율기 삽입, 둔부 골절 수술 등을 포함한다. 다른 실시양태에서, 급성 대출혈은 명백한 원인 없는 자발적 출혈일 수 있다.

[0044] 급성 대출혈의 부위는 위장 출혈, 피하 또는 근육내 출혈, 방광 출혈, 혈관절증, 경막하혈종, 코 출혈, 복막 출혈, 자궁 출혈 및 다른 출혈 부위를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0045] 본 개시내용의 FXa 변이체를 사용한 효과적인 치료는 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시킬 수 있다. FXa 변이체에 의한 이러한 효과의 성공적인 역전을 다양한 방식으로 측정할 수 있고, 상이한 분석, 방법 또는 중점을 이용하여 측정할 수 있거나 모니터링할 수 있다.

[0046] 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기 위한 FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체로 치료받는 대상체로부터의 혈액 또는 혈장에 대해 수행된 시험 또는 분석을 이용함으로써 모니터링된다. FXa 변이체를 사용한 치료 후 예정된 시간에서 대상체로부터 혈액 샘플을 채취할 수 있다. 그 다음, 혈액 또는 이로부터 제조된 혈장에 대해 하나 이상의 시험을 수행하여 직접적인 FXa 억제제의 존재에도 불구하고 일부 지혈 약력학적 파라미터가 정상화되어 있는지를 확인한다. 정상화가 발견된 경우, 대상체는 FXa 변이체로 더 치료될 필요가 없다. 그러나, 정상화가 발견되지 않는 경우, 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기 위해 본 개시내용의 방법에 따른 FXa 변이체를 사용한 추가 치료가 요구될 수 있다. FXa 변이체를 사용한 치료의 효능을 모니터링하기 위한 시험은 응고하는 능력을 직접적으로 또는 간접적으로 측정하거나 직접적인 FXa 억제제의 활성을 측정하는 시험을 포함한다. 비-한정적인 예시적인 시험은 프로트롬빈 시간 또는 관련된 국제 정상화 비, 프로트롬비나제-유도된 응고 시간 분석, 혈전탄성측정, 혈전탄성촬영, 발색 항-FXa 분석, 트롬빈 생성 분석, 프로

트롬빈 단편 1+2의 수준, 트롬빈-항트롬빈 III 복합체의 수준, 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 및 부분적 트롬보플라스틴 시간을 포함한다. 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 지식 내에서 다른 시험도 가능하다.

[0047] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 대상체에서 출혈을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체를 사용한 치료의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 출혈을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소시킨다. 다른 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체에서 출혈을 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100% 감소시킨다.

[0048] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 상기 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체를 사용한 치료의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 활성을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소시킨다. 다른 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 활성을 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100% 감소시킨다.

[0049] 직접적인 FXa 억제제의 활성은 발색 항-FXa 분석, 예컨대, 문헌(Asmis, et al., Thromb Res., 129:492-498 (2012)) 및 문헌(Barrett, et al., Thromb Haemost. 104:1263-71 (2010))(이들 각각은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 발색 항-FXa 분석을 이용함으로써 모니터링될 수 있다.

[0050] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 상기 대상체의 혈액 또는 혈장에서 생성된 트롬빈의 양을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 트롬빈 생성을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배 또는 50배 이상 증가시킨다. 대상체의 혈액 또는 혈장에서의 트롬빈 생성은 트롬빈 생성 분석(TGA) 또는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 익숙한 다른 기법을 이용함으로써 측정될 수 있다.

[0051] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 상기 대상체에서 응고를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 응고를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배 또는 50배 이상 증가시킨다.

[0052] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 상기 대상체에서 응고 시간을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체를 사용한 치료의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 응고 시간을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소시킨다. 다른 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체에서 응고 시간을 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100% 감소시킨다.

[0053] 일부 실시양태에 따라, 응고 시간은 지혈이 회복됨에 따라 감소하는 대상체의 프로트롬빈 시간(PT)을 측정함으로써 결정된다. PT는 조직 인자의 첨가 후 혈청이 응고하는 데에 소요되는 시간의 양이다. 따라서, PT는 응고를 뒷받침하는 외인성 응고 시스템의 능력을 측정한다. PT는 실험실에서 시험을 수행하기 위해 사용하는 구체적인 시약들에 따라 달라질 수 있지만, 정상 PT는 약 11초 내지 13초이다. 응고 시간은 응고 시간 측정에 있어서 실험실 대 실험실 가변성을 제거하는 국제 정상화 비(INR)를 사용함으로써 표현될 수도 있다. INR을 사용할 때, 0.8 내지 1.1의 비는 정상 응고를 표시한다. PT 또는 INR은 FXa 변이체가 직접적인 FXa 억제제의 효과의 역전을 필요로 하는 대상체에게 투여된 후 예정된 시간에서 측정될 수 있다.

[0054] 일부 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기 위한 FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체의 PT를 약 25초, 24초, 23초, 22초, 21초, 20초, 19초, 18초, 17초, 16초, 15초, 14초, 13초, 12초, 11초 또는 10초 이하까지 감소시킨다. 다른 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체의 INR을 약 4.0, 3.9, 3.8,



3.7, 3.6, 3.5, 3.4, 3.3, 3.2, 3.1, 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 2.6, 2.5, 2.4, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8 또는 0.7 이하까지 감소시킨다. 다른 실시양태에 따라, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체에서 PT 또는 INR을 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100% 감소시킨다.

[0055] 프로트롬빈 시간은 FXa 변이체의 투여 후 예정된 시간에서 측정될 수 있다. 따라서, 일부 비-한정적인 실시양태에서, PT는 FXa의 투여 후 15분, 20분, 30분, 40분, 45분, 50분 또는 60분 이상 후에 측정된다. 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 지식에 따라 다른 시간도 가능하다.

[0056] 응고 시간은 문헌(Graff, et al., Monitoring effects of direct FXa-inhibitors with a new one-step prothrombinase-induced clotting time (PiCT) assay: comparative in vitro investigation with heparin, enoxaparin, fondaparinux and DX 9065a, Int J Clin Pharmacol Ther., 45:237-43 (2007)) 및 문헌(Harder, et al., Monitoring direct FXa-inhibitors and fondaparinux by Prothrombinase-induced Clotting Time (PiCT): relation to FXa-activity and influence of assay modifications, Thromb Res., 123:396-403 (2008))(이들 각각은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 1-단계 프로트롬비나제-유도된 응고 시간(PiCT) 분석을 이용함으로써 측정될 수도 있다.

[0057] 다른 실시양태에서, 혈전탄성측정 또는 혈전탄성촬영 방법을 이용하여 응괴 형성 또는 응고 시간을 분석할 수 있다.

[0058] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 대상체의 혈액 또는 혈장에서 프로트롬빈 단편 1+2(PF1+2)의 수준을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 PF1+2를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배 또는 50배 이상 증가시킨다.

[0059] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 대상체의 혈액 또는 혈장에서 트롬빈-항트롬빈 III 복합체(TAT)의 수준을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 TAT를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배 또는 50배 이상 증가시킨다.

[0060] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 대상체에서 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간(aPTT)을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체를 사용한 치료의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간(aPTT)을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소시킨다. 다른 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체에서 aPPT를 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100% 감소시킨다.

[0061] 일부 실시양태에 따라, FXa 변이체를 투여하여 대상체에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 것은 대상체에서 부분적 트롬보플라스틴 시간(PTT)을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 FXa 변이체를 사용한 치료의 부재에 비해 직접적인 FXa 억제제의 존재 하에서 대상체에서 부분적 트롬보플라스틴 시간(PTT)을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소시킨다. 다른 실시양태에서, FXa 변이체를 사용한 치료는 대상체에서 PPT를 약 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 또는 95% 내지 100% 감소시킨다.

[0062] 다른 실시양태에서, 임상 증점은 지혈이 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기 위해 FXa 변이체로 치료받는 대상체에서 적절하게 회복되었는지를 확인하는 것에 의해 좌우될 수 있다. 예를 들면, 대상체가 급성 출혈을 나타내는 경우, 임상 지혈 효능은 기존 출혈의 즉각적인 중단이 FXa 변이체를 사용한 치료 후 일어나는 경우 "

매우 우수한 효능"으로 기록될 수 있고; 출혈 중단에 있어서 1시간 내지 2시간의 지연이 있는 경우 "만족스러운 효능"으로 기록될 수 있고; 출혈 중단에 있어서 2시간 초과 지연이 있는 경우 "의심스러운 효능"으로 기록될 수 있고; 출혈에 대한 효과가 없는 경우 "효능 부재"로 기록될 수 있다. FXa 변이체를 사용한 치료가 만족스러운 효능 미만의 효능을 나타내는 것으로 확인되는 경우, 추가 용량의 FXa 변이체를 투여하여 적절한 지혈을 달성할 수 있다. 추가 예에서, 대상체가 중재 절차를 받는 경우, 임상 지혈 효능은 정상 지혈이 상기 절차 동안 달성되는 경우 "매우 우수한 효능"으로 기록될 수 있고; 절차내 지혈이 혈액 손실의 양 또는 질에 의해 판단될 때 경미하게 비정상(예를 들면, 약한 삼출)인 경우 "만족스러운 효능"으로 기록될 수 있고; 절차내 지혈이 혈액 손실의 양 또는 질에 의해 판단될 때 중간 수준으로 비정상(예를 들면, 조절가능한 출혈)인 경우 "의심스러운 효능"으로 기록될 수 있고; 절차내 지혈이 혈액 손실의 양 또는 질에 의해 판단될 때 심각하게 비정상(예를 들면, 심각한 불응성 출혈)인 경우 "효능 부재"로 기록될 수 있다.

[0063] 직접적인 FXa 억제제의 치료 유효 용량은 당분야에서 기술을 가진 의료인에게 잘 공지되어 있는 다수의 인자들에 의해 좌우된다. 리바록사반의 전형적인 치료 혈장 농도는 약 500 nM이다. 그러나, 본 개시내용에 따라, FXa 변이체를 투여하여 보다 더 낮은 또는 보다 더 높은 농도의 억제제를 길항할 수 있다. FXa 변이체로 치료 받을 대상체에서 리바록사반의 혈장 농도는 전형적인 치료 농도보다 더 낮거나 더 높은 농도, 예를 들면, 약 100 nM, 약 200 nM, 약 300 nM, 약 400 nM, 약 500 nM, 약 600 nM, 약 700 nM, 약 800 nM, 약 900 nM 또는 약 1,000 nM일 수 있다.

[0064] 아픽사반의 전형적인 치료 혈장 농도는 약 250 nM이다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체를 약 100 nM, 약 200 nM, 약 300 nM, 약 400 nM, 약 500 nM, 약 600 nM, 약 700 nM, 약 800 nM, 약 900 nM 또는 약 1,000 nM의 혈장 농도의 아픽사반과 함께 대상체에게 투여한다.

[0065] 마찬가지로, 본 개시내용에 따라, FXa 변이체는 과다복용의 경우, 예컨대, 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도가 전형적인 치료 혈장 농도보다 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 1.5배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 10배 이상, 15배 이상, 20배 이상, 25배 이상, 30배 이상 또는 50배 이상 더 높은 경우 직접적인 FXa 억제제를 길항하기 위해 사용될 수 있다.

[0066] FXa 변이체는 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도보다 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 FXa 억제제를 길항하는 데 있어서 놀라울 정도로 효과적이다. 본 개시내용에 따라, FXa 변이체는 약 1 대 10, 약 1 대 25, 약 1 대 50, 약 1 대 100, 약 1 대 250, 약 1 대 500, 약 1 대 1,000, 약 1 대 2,500, 약 1 대 5,000 또는 약 1 대 10,000의 변이체 대 억제제의 혈장 농도 비에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 길항한다. 일부 실시양태에서, FXa 변이체는 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도보다 10배 이상, 25배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 250배 이상, 500배 이상, 1,000배 이상, 2,500배 이상, 5,000배 이상 또는 10,000배 이상 더 낮은 혈장 농도에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 길항한다.

[0067] 다른 실시양태에서, 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키기에 충분한 FXa 변이체의 혈장 농도는 상기 직접적인 억제제의 혈장 농도와 약  $0.1 \times 10^{-4}$  내지 약  $1,000 \times 10^{-4}$ , 약  $4 \times 10^{-4}$  내지 약  $40 \times 10^{-4}$ , 약  $20 \times 10^{-4}$  내지 약  $200 \times 10^{-4}$  또는 다른 범위의 전환 계수를 곱함으로써 계산된다. 다른 실시양태에서, 전환 계수는 약  $0.1 \times 10^{-4}$ ,  $0.5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $6 \times 10^{-4}$ ,  $7 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $9 \times 10^{-4}$ ,  $10 \times 10^{-4}$ ,  $11 \times 10^{-4}$ ,  $12 \times 10^{-4}$ ,  $13 \times 10^{-4}$ ,  $14 \times 10^{-4}$ ,  $15 \times 10^{-4}$ ,  $16 \times 10^{-4}$ ,  $17 \times 10^{-4}$ ,  $18 \times 10^{-4}$ ,  $19 \times 10^{-4}$ ,  $20 \times 10^{-4}$ ,  $21 \times 10^{-4}$ ,  $22 \times 10^{-4}$ ,  $23 \times 10^{-4}$ ,  $24 \times 10^{-4}$ ,  $25 \times 10^{-4}$ ,  $26 \times 10^{-4}$ ,  $27 \times 10^{-4}$ ,  $28 \times 10^{-4}$ ,  $29 \times 10^{-4}$ ,  $30 \times 10^{-4}$ ,  $31 \times 10^{-4}$ ,  $32 \times 10^{-4}$ ,  $33 \times 10^{-4}$ ,  $34 \times 10^{-4}$ ,  $35 \times 10^{-4}$ ,  $36 \times 10^{-4}$ ,  $37 \times 10^{-4}$ ,  $38 \times 10^{-4}$ ,  $39 \times 10^{-4}$ ,  $40 \times 10^{-4}$ ,  $45 \times 10^{-4}$ ,  $50 \times 10^{-4}$ ,  $55 \times 10^{-4}$ ,  $60 \times 10^{-4}$ ,  $65 \times 10^{-4}$ ,  $70 \times 10^{-4}$ ,  $75 \times 10^{-4}$ ,  $80 \times 10^{-4}$ ,  $85 \times 10^{-4}$ ,  $90 \times 10^{-4}$ ,  $95 \times 10^{-4}$ ,  $100 \times 10^{-4}$ ,  $110 \times 10^{-4}$ ,  $120 \times 10^{-4}$ ,  $130 \times 10^{-4}$ ,  $140 \times 10^{-4}$ ,  $150 \times 10^{-4}$ ,  $160 \times 10^{-4}$ ,  $170 \times 10^{-4}$ ,  $180 \times 10^{-4}$ ,  $190 \times 10^{-4}$ ,  $200 \times 10^{-4}$ ,  $250 \times 10^{-4}$ ,  $300 \times 10^{-4}$ ,  $350 \times 10^{-4}$ ,  $400 \times 10^{-4}$ ,  $450 \times 10^{-4}$ ,  $500 \times 10^{-4}$ ,  $550 \times 10^{-4}$ ,  $600 \times 10^{-4}$ ,  $650 \times 10^{-4}$ ,  $700 \times 10^{-4}$ ,  $750 \times 10^{-4}$ ,  $800 \times 10^{-4}$ ,  $850 \times 10^{-4}$ ,  $900 \times 10^{-4}$ ,  $950 \times 10^{-4}$  또는  $1000 \times 10^{-4}$ , 및 이 수치들 사이의 범위일 수 있다. 직접적인 FXa 억제제의 혈장 농도는 당업자의 지식에 따라, 예를 들면, 방사면역분석(RIA) 또는 다른 방법에 의해 측정될 수 있다.

- [0068] 직접적인 FXa 억제제의 과다복용을 역전시키기에 충분한 FXa 변이체의 목표 혈장 농도를 달성하는 것은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 지식 내에 있다. 비-한정적인 예에서, 관련 약동학적 파라미터, 예컨대, 대상체 혈장 부피 또는 다른 파라미터는 대상체의 성별, 신장 및 체중, 또는 다른 인자에 근거하여 추정될 수 있고, 목표 농도를 달성하기 위해 얼마나 많은 FXa 변이체가 투여될 필요가 있는지를 계산하는 데에 사용될 수 있다. FXa 변이체의 투여 후, 혈장 농도는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 지식에 따라 모니터링될 수 있고, 이 정보는 임의의 원하는 범위 내에서 농도를 유지하는 데에 사용된다.
- [0069] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 "치료 유효량" 또는 "예방 유효량"의 FXa 변이체를 포함한다. "치료 유효량"은 필요한 용량에서 필요한 시간 동안 원하는 치료 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. FXa 변이체의 치료 유효량은 개체의 질량 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유발하는 FXa 변이체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료 유효량은 치료적으로 유리한 효과가 FXa 변이체의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 능가하는 양이다. "예방 유효량"은 필요한 용량에서 필요한 시간 동안 원하는 예방 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 예를 들면, 용량은 계획된 수술 전 제공될 수 있다.
- [0070] 투약 요법은 최적 원하는 반응(예를 들면, 치료 또는 예방 반응)을 제공하도록 조절될 수 있다. 예를 들면, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 여러 분할된 용량이 시간의 경과에 따라 투여될 수 있거나, 용량이 치료 상황의 응급에 의해 표시된 바와 같이 비례적으로 감소될 수 있거나 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 용량 유닛 제형으로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용량 유닛 제형은 치료받을 포유동물 대상체를 위한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 분리된 유닛을 지칭하고; 각각의 유닛은 요구된 약학 담체와 함께 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 예정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 개시내용의 용량 유닛 제형에 대한 요건은 (a) FXa 변이체의 독특한 특성 및 달성될 구체적인 치료 또는 예방 효과, 및 (b) 개체의 치료를 위해 이러한 FXa 변이체를 조제하는 분야에 내재하는 한계에 의해 좌우되고 상기 (a) 및 (b)에 직접적으로 의존한다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 투여되는 FXa 변이체의 치료 또는 예방 유효량은 약 0.0001 내지 50 mg/kg, 약 0.001 내지 50 mg/kg, 약 0.001 내지 5 mg/kg, 약 0.001 내지 0.5 mg/kg, 약 0.001 내지 0.05 mg/kg, 약 0.01 내지 5 mg/kg, 또는 약 0.01 내지 0.5 mg/kg이다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 FXa 변이체의 치료 또는 예방 유효 혈청 농도는 약 0.0003 내지 300 nM, 약 0.003 내지 300 nM, 약 0.03 내지 300 nM, 약 0.003 내지 30 nM, 약 0.03 내지 30 nM, 또는 약 0.3 내지 3 nM이다. 예를 들면, 혈액 또는 혈장에서 FXa 변이체의 농도는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0073] 용량 값은 FXa 억제제 농도에 따라 달라질 수 있다는 것을 인지해야 한다. 임의의 구체적인 대상체를 위한 구체적인 투약 요법은 개체 요구, 및 조성물을 투여하거나 조성물의 투여를 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간의 경과에 따라 조절되어야 하고 본원에 기재된 용량 범위는 예시적인 범위일 뿐이고 특허청구된 조성물의 범위 또는 실시를 한정하기 위한 것이 아니라는 것도 이해해야 한다.
- [0074] 본 개시내용의 또 다른 양태는 FXa 변이체, 또는 이러한 FXa 변이체를 포함하는 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 상기 FXa 변이체 또는 조성물 이외에 진단제 또는 추가 치료제를 포함할 수 있다. 키트는 치료 방법에서 사용될 설명서뿐만 아니라, 포장재, 예컨대, 얼음, 드라이 아이스, 스티로폼, 발포체, 플라스틱, 셀로판, 수축 랩, 기포 랩, 카드보드 및 전분 땅콩(그러나, 이들로 한정되지 않음)도 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 키트는 FXa 변이체 또는 이를 포함하는 조성물, 및 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있는 하나 이상의 치료제를 포함한다.
- [0075] 적절한 지혈이 회복되거나 직접적인 FXa 억제제 또는 억제제들이 더 이상 효과적이지 않을 때까지 FXa 변이체는 예를 들면, 이를 포함하는 조성물 형태로 대상체에게 1회 또는 다회 투여될 수 있다. 다회 투여가 이용되는 경우, FXa 변이체는 매시간, 매일, 또는 임의의 다른 적절한 간격(예를 들면, 다회 매일 용량을 포함함)으로 투여될 수 있다. 다회 용량은 일정에 따라, 예컨대, 10분마다, 15분마다, 20분마다, 30분마다, 매시간, 2시간마다, 3시간마다, 4시간마다, 매일 3회, 매일 2회, 매일 1회, 2일마다 1회, 3일마다 1회 또는 매주 1회 투여될 수 있다. FXa 변이체는 연속적으로, 예를 들면, 미니펌프를 통해 투여될 수도 있다. FXa 변이체는 예를 들면, 비경구 경로를 통해(예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내 또는 근육내) 투여될 수 있다. FXa 변이체는 일반적으로 이하에 기재된 약학 조성물의 일부로서 투여될 것이다.
- [0076] 또 다른 실시양태에서, FXa 변이체는 또 다른 FXa 변이체, 인자 IX, 인자 XIa, 인자 XIIa, 인자 VIII, 인자

VIIa, FEIBA 및 프로트롬빈 복합체 농축물(PCC)을 포함하는 또 다른 전구응고제와 공-투여될 수 있다.

[0077]

추가 치료제와 본 개시내용의 FXa 변이체의 공-투여(조합 치료)는 FXa 변이체 및 추가 치료제를 포함하는 약학 조성물의 투여, 및 2개 이상의 별개의 약학 조성물들, 즉 FXa 변이체를 포함하는 1개의 약학 조성물 및 추가 치료제(들)를 포함하는 다른 약학 조성물(들)의 투여를 포괄한다. 공-투여 또는 조합 치료는 FXa 변이체 및 추가 치료제(들)를 동시에 또는 순차적으로, 또는 이들 둘다로 투여하는 것도 포함한다. 예를 들면, FXa 변이체는 3일마다 1회 투여될 수 있는 반면, 추가 치료제는 FXa 변이체와 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 매일 1회 투여된다. FXa 변이체는 추가 치료제를 사용한 치료 전 또는 후 투여될 수 있다. 유사하게, 본 개시내용의 FXa 변이체의 투여는 수술을 비롯한 다른 치료 방식을 포함하는 치료 요법의 일부일 수 있다. 조합 치료는 질환의 재발을 예방하기 위해 투여될 수 있다. 조합 치료는 매시간 다회 내지 매주 투여될 수 있다. 일정에 따라, 예컨대, 10분마다, 15분마다, 20분마다, 30분마다, 매시간, 2시간마다, 3시간마다, 4시간마다, 매일 3회, 매일 2회, 매일 1회, 2일마다 1회, 3일마다 1회 또는 매주 1회 투여될 수 있거나, 연속적으로, 예를 들면, 미니펌프를 통해 투여될 수 있다. 조합 치료는 예를 들면, 비경구 경로를 통해(예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내 또는 근육내) 투여될 수 있다.

[0078]

추가 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 직접적인 FXa 억제제를 길항하는 데에 사용될 FXa 변이체를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 생리학적으로 상용가능한 약학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 다른 성분을 포함할 수 있다. 이러한 담체, 비히클 또는 다른 성분의 비-한정적인 예에는 용매(예를 들면, 물, 에탄올, 식염수, 포스페이트 완충 식염수), 세제, 계면활성제, 분산 매질, 코팅제, 항균제, 항진균제, 등장화제, 흡수 지연제, 당(예를 들면, 수크로스, 텍스트로스, 락토스), 폴리알코올(예를 들면, 글리세롤, 만니톨, 소르비톨), 염(예를 들면, 염화나트륨, 염화칼륨), 습윤화제, 유화제, 방부제, 완충제, 및 FXa 변이체의 안정성 또는 효능을 향상시킬 수 있는 물질이 포함된다.

[0079]

본 개시내용에 따라 사용될 조성물은 대상체에게 투여될 임의의 적합한 형태, 예컨대, 액체 용액(예를 들면, 주사가 가능한 용액 및 관주가 가능한 용액)일 수 있다. 조성물은 대상체에게 투여될 준비가 된 예비혼합된 포맷, 예를 들면, 바이알 또는 예비충진된 주사기로 제공될 수 있다. 이러한 포맷은 투여 전 희석제를 사용한 재구성을 요구하지 않는다. 대안적으로, 조성물은 투여 전 희석제(예를 들면, 멸균 물 또는 식염수)를 사용한 재구성을 요구하는 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 후자의 경우, 희석제는 별도의 용기 내의 동결건조물과 함께 제공될 수 있다. 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 지식에 따라, 조성물은 냉장 하에서 또는 실온에서 저장을 위해 제제화될 수 있다. 조성물의 형태는 적어도 부분적으로 의도된 투여 방식에 의해 좌우된다. 일부 실시양태에서, 투여 방식은 예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 투여를 포함하는 비경구 투여이다.

[0080]

치료 조성물은 전형적으로 제조 및 저장 조건 하에서 멸균성 및 안정성을 가져야 한다. 상기 조성물은 용액, 미세유액, 분산물, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조물로서 제제화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 용액은 요구된 양의 FXa 변이체를 상기 나열된 성분들 중 하나 또는 이들의 조합물과 함께 적절한 용매 내로 도입한 후, 필요에 따라 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 염기성 분산 매질, 및 상기 나열된 성분들 중 요구된 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성 화합물을 도입함으로써 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 및 임의의 추가 원하는 성분으로 구성된 분말을 이의 미리 멸균 여과된 용액으로부터 생성하는 진공 동결 및 냉동 건조이다. 용액의 적절한 유동성은 예를 들면, 코팅제, 예컨대, 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우 요구된 입자 크기의 유지에 의해, 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0081]

본원의 임의의 조성물을 직접적인 FXa 억제제로 치료받는 대상체에게 투여할 수 있다는 것도 본 개시내용에 의해 고려된다.

[0082]

본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 예시하기 위한 것일 뿐이고, 이를 고려할 때 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 명확할 것이고 본 발명의 진정한 범위 내에 포함되어야 하고 본 발명의 진정한 범위를 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있다는 것이 이해된다.

[0083]

**실시예**

[0084]

**실시예 1 - 리바록사반에 대한 FXa<sup>116L</sup> 민감성.**

[0085]

리바록사반에 대한 FXa<sup>116L</sup>의 민감성을 시험하기 위해, 억제 분석을 확립하였다. 리바록사반은 0.582 nM의 억제



상수( $K_i$ )를 나타내는 야생형 FXa의 효율적인 억제제이었다(도 1a). FXa<sup>116L</sup>의 자이모겐-유사 성질로 인해, 리바록사반은 약 15배 감소된 친화성으로 이 변이체에 결합하였다( $K_i = 9.3 \text{ nM}$ )(도 1b). 대조적으로, 상기 변이체가 프로트롬비나제 복합체로 조립된 경우(즉, FVa 및 인지질 소포의 첨가 시), 리바록사반에 대한  $K_i$ 는 거의 야생형 효소에 필적할만한 값까지 회복되었다(wt FXa,  $K_i = 2.67 \text{ nM}$ (도 2a); FXa<sup>116L</sup>,  $K_i = 3.4 \text{ nM}$ (도 2b)).

[0086] **실시예 2 - FXa 변이체는 리바록사반 및 아픽사반을 길항한다.**

[0087] 자이모겐-유사 FXa 변이체가 보다 더 생리학적 환경에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시킬 수 있는지를 평가하기 위해 트롬빈 생성 분석(TGA)을 이용하였다. TGA는 응고의 시작 후 시간의 경과에 따라 혈장에서의 트롬빈 생성을 측정하고 이미 공지된 바와 같이(전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Bunce et al., (2011) Blood 117, 290-298) 참조) 수행되었다. 500 nM 리바록사반의 존재 또는 부재 하에서 37°C에서 90분 동안 정상 인간 혈장에서의 트롬빈 생성을 측정하였다. FXa<sup>116L</sup>이 리바록사반의 효과를 역전시킬 수 있는지를 평가하기 위해, 증가하는 양의 FXa<sup>116L</sup>을 500 nM 리바록사반을 함유하는 혈장에 첨가하였다. 2.0 pM 조직 인자/4  $\mu\text{M}$  인지질, 및  $\text{CaCl}_2$  및 트롬빈 형광생성 기질을 사용하여 트롬빈 생성을 시작하였다.

[0088] 데이터는 500 nM 리바록사반의 존재 하에서의 혈장의 트롬빈 생성 프로파일이 리바록사반의 부재 하에서의 혈장에 비해 실질적으로 감소되었다는 것을 입증하였다. 대조적으로, 0.03 nM부터 1 nM까지 증가하는 농도의 FXa<sup>116L</sup>이 트롬빈 생성을 회복시켰다(도 3). 이 데이터는 나노몰 및 나노몰 미만 범위 내의 예상외로 낮은 농도의 FXa<sup>116L</sup>이 억제제의 효과를 역전시킬 수 있다는 것을 보여준다. 500 nM(전형적인 치료 혈장 농도) 리바록사반의 존재 하에서의 FXa<sup>116L</sup>의 용량 반응 분석은 트롬빈 생성의 피크 높이(도 4a 및 4c) 및 생성된 총 트롬빈(ETP)(도 4b 및 4d)이 본질적으로 최대치에 도달하였고 이 조건들 하에서 1 내지 3 nM의 정상 FXa<sup>116L</sup> 수준까지 완전히 회복되었다는 것을 보여준다. 추가 실험은 높은 농도의 리바록사반(7.5  $\mu\text{M}$ ; 치료 농도 초과 농도)의 존재 하에서조차도 FXa<sup>116L</sup>이 피크 트롬빈(도 5a) 및 생성된 총 트롬빈(도 5b)을 회복시키는 데에 있어서 상대적으로 낮은 용량( $\leq 3.0 \text{ nM}$ )에서 여전히 꽤 효과적이었다는 것을 보여주었다.

[0089] 또한, FXa 자이모겐-유사 변이체가 또 다른 직접적인 FXa 억제제인 아픽사반의 효과를 역전시킬 수 있는지를 평가하기 위해 유사한 실험을 수행하였다. 이 실험에서, FXa<sup>116L</sup>의 효능과 또 다른 자이모겐-유사 FXa 변이체인 FXa<sup>116T</sup>의 효능도 비교하였다. FXa<sup>116T</sup>는 FXa<sup>116L</sup>과 유사하나, 본질적으로 보다 더 낮은 활성을 갖고, 보다 더 긴 혈장 반감기를 갖고, 프로트롬비나제 복합체로 조립된 경우 FXa<sup>116L</sup>에 비해 약 3배 내지 5배 감소된 활성을 갖는다. 리바록사반 데이터와 마찬가지로, FXa<sup>116L</sup>은 250 nM(전형적인 치료 혈장 농도) 아픽사반의 존재 하에서 피크 트롬빈(도 6a) 및 생성된 총 트롬빈(도 6b)(1 내지 3 nM의 FXa<sup>116L</sup>에서 최대치에 도달하는 것으로 보임)을 용량 의존적 방식으로 회복시킬 수 있었다. FXa<sup>116T</sup>도 아픽사반의 효과를 역전시키는 데에 있어서 효과적이었으나, 트롬빈 생성을 완전히 회복시키기 위해 보다 더 높은 농도의 이 변이체가 필요한 것으로 보인다(도 6). 상기 두 변이체들은 보다 더 높은 농도(2  $\mu\text{M}$ )의 아픽사반의 존재 하에서조차도 여전히 효과적이었다. 그러나, 이 조건들 하에서 트롬빈 생성을 완전히 회복시키기 위해 보다 더 높은 농도의 상기 두 변이체들이 필요한 것으로 보인다(도 7a 및 7b).

[0090] **실시예 3 - FXa<sup>116L</sup>은 전혈에서 리바록사반 및 아픽사반을 길항한다.**

[0091] 전혈에서 직접적인 FXa 억제제의 효과를 역전시키는 FXa<sup>116L</sup> 변이체의 능력을 평가하기 위해 전혈 혈전탄성측정을 이용하였다. 이 시스템에서, 건강한 지원자들로부터 혈액을 채취하였다. 처음 2 ml의 혈액을 따라내고, 후속 5 ml의 혈액을 진공채혈관(비디(BD), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재) 내로 채취하였다. 옥수수 트립신 억제제 및 나트륨 시트레이트는 혈액 중의 최종 농도 0.105 M 시트레이트 및 25  $\mu\text{g/ml}$  옥수수 트립신 억제제(해마톨로지 테크놀로지스(Haematologic Technologies), 미국 버몬트주 버링톤 소재)를 달성하기 위해 혈액 샘플의 채취 전 채혈 튜브 내에 존재하였다. 각각의 공여자에 대해 2 세트의 반응을 분석하였다. 제1 반응은 혈액 채취로부터 5분 후 시작되었다. 제2 반응은 제1 반응의 시작으로부터 1시간 후(채취로부터 1시간 5분 후) 시작되

었다.

[0092]

혈전탄성측정 ROTEM(등록상표)델타(템 인터내셔널 게엠베하(Tem International GmbH), 독일 뮌헨 소재)를 이용하여 혈액을 분석하였다. 반응을 위해, (1) 6  $\mu$ l의 비히클, 단백질 및/또는 억제제를 빈 컵에 첨가하고, (2) 20  $\mu$ l의 0.2 M  $\text{CaCl}_2$ (최종 농도 11.6 mM) 및 (3) 20  $\mu$ l의 인노빈(Innovin)(반응 중의 최종 농도 1:10,000; 조직 인자의 공급원)을 상기 컵에 첨가하였다. 전술된 바와 같이 채취된 전혈을 반응물에 첨가하고(300  $\mu$ l) 약 30분 내지 60분 동안 기록이 진행되게 하였다. 제조자의 소프트웨어(로템 감마(Rotem Gamma) 소프트웨어 버전 1.1.1)를 이용하여 수집된 데이터를 분석하였다.

[0093]

리바록사반 또는 아픽사반의 존재 하에서 전혈 응고 형성을 가속화하는  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 의 능력을, 회전 혈전탄성측정(ROTEM)을 이용하여 조사하였다. 두 상이한 농도에서 직접적인  $\text{FXa}$  억제제들 둘다가 단독으로 전혈 응고 형성에 상당한 영향을 미쳤다: 낮은 용량(치료 농도)에서 전혈 응고 형성은 부분적으로 제거되는 반면(도 8a 및 9a), 높은 용량(치료 농도 초과 농도)에서 전혈 응고 형성은 거의 완전히 제거된다(도 8b 및 9b). 전혈 응고 형성에 대한 리바록사반 또는 아픽사반의 효과는  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 에 의해 역전될 수 있었다. 500 nM 리바록사반 또는 250 nM 아픽사반의 존재 하에서 0.3 nM  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 은 전혈 응고를 완전히 또는 거의 완전히 회복시킬 수 있었다(도 8a 및 9a). 보다 더 높은 농도(약 2  $\mu$ M)의 직접적인  $\text{FXa}$  억제제가 사용된 경우, 0.3 nM  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 은 전혈 응고를 부분적으로 회복시켰고 3 nM  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 은 전혈 응고를 완전히 회복시켰다(도 8b 및 9b). 이 데이터는  $\text{FXa}$  자이모겐-유사 변이체가 억제제의 치료 농도 및 치료 농도 초과 농도 둘다에서의 혈장-기초 응고 분석 및 전혈 응고 분석에서 리바록사반 또는 아픽사반의 항응고 효과를 효과적으로 역전시킬 수 있다는 것을 입증하였다.

[0094]

$\text{FXa}^{116\text{L}}$  및 리바록사반 둘다가 생체내로 투여된 경우  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 이 리바록사반의 항응고 효과를 길항할 수 있는지를 시험함으로써 이 연구의 결과를 확인하고 연장하였다. 이 실험에서, 꼬리 정맥을 통해 리바록사반(1 mg/kg) 또는 완충제를 C57BL/6 마우스에게 관주하였다. 그 다음, 마우스가 경정맥 및 대정맥을 노출하도록 준비하였다. 약 10분 후,  $\text{FXa}^{116\text{L}}$  (1 또는 2 mg/kg)을 직접적인 주입으로 경정맥 내로 관주하였다. 주입으로부터 5분 후, 대정맥을 통해 혈액을 시트레이트 및 옥수수 트립신 억제제 내로 채취하였다. 그 다음, 희석된 조직 인자(인노빈, 1:42,000 희석)를 사용하여 ROTEM으로 채취된 혈액을 분석하였다. 완충제만을 투여받은 마우스로부터의 전혈은 약 2분까지 응고되었다(도 12). 1 mg/kg 리바록사반의 투여는 응고 시간을 약 10분까지 상당히 연장시켰다(도 12).  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 의 추가 투여는 리바록사반의 존재 하에서 응고 시간을 용량 의존적 방식으로 단축시켰다(도 12).

[0095]

**실시예 4 -  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 은 트롬빈 생성 분석에서 리바록사반을 길항한다.**

[0096]

보정된 자동화 혈전촬영(thrombography)(CAT) 시스템(트롬비노스코프 비브이(Thrombinoscope BV), 네덜란드 마아스트리흐트 소재)을 이용하여 혈장에서의 리바록사반의 역전에 대한  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 의 효과를 혈전 생성 분석(TGA)에서 조사하였다. 정상 인간 혈장을 조지 킹 바이오메디칼(미국 캔사스주 오버랜드 파크 소재)로부터 입수하였다. 반응에서, 4  $\mu$ M 인지질 및 1 pM 조직 인자를 함유하는 20  $\mu$ l의 PPP-시약 LOW를 임플론(Immulon) 2HB 환저 96 웰 플레이트 내의 70  $\mu$ l 폴링된 시트레이트-첨가된 정상 인간 혈장(치료 혈장 농도 범위 내의 250 nM 리바록사반으로 처리됨)에 첨가하였는데, 이때 반응을 이중으로 수행하였다. 반응 시작 직전에, 120  $\mu$ l의 총 반응 부피가 주어졌을 경우, 10  $\mu$ l의 비히클 또는  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 을 0.03125 내지 0.5 nM  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 의 최종 농도로 혈장에 첨가하였다. 염화칼슘 및 형광생성 기질을 함유하는 20  $\mu$ l의 플루카(FluCa) 완충제를 첨가하여 반응을 시작하였다. 플루오로스칸 아센트(Fluoroskan Ascent) 형광측정기 상에서 20초 간격으로 37°C에서 혈장 반응의 형광도를 판독하고 기준 트롬빈 보정제 반응의 형광도와 비교하여 트롬빈 농도를 측정하였다. CAT를 사용하여 37°C에서 형광 신호의 강도(FU)를 연속적으로 모니터링하였다. 트롬보스코프 소프트웨어(트롬비노스코프 비브이(Thrombinoscope BV) 버전)를 이용하여 트롬빈 생성 곡선(nM 트롬빈 대 시간)을 분석하여 지연(lag) 시간, 피크 높이, 피크까지의 시간, 및 내생성 트롬빈 생성력(ETP)을 나타내는 곡선 하의 면적을 추출하였다.

[0097]

시험관내 리바록사반 처리(5 내지 200 nM)를 이용한 경우 정상 인간 혈장에서 트롬빈 생성의 용량 의존적 억제 가 관찰되었다(도 10a). 리바록사반은 피크 트롬빈의 감소 및 ETP의 감소와 커플링된 지연 시간의 증가를 야기하였다. 리바록사반(250 nM)에 의해 억제된 인간 혈장의  $\text{FXa}^{116\text{L}}$ 의 첨가는 트롬빈 억제의 용량 의존적 역전을 야기하였다(도 10b): 피크 트롬빈 생성이 회복되었고, 지연 시간이 더 짧아졌고 ETP가 증가하였다. 낮은 용량

인 0.03125 nM의 FXa<sup>116L</sup>에서, 트롬빈 생성은 비히클로 처리된 정상 인간 혈장에 필적할만한 수준까지 회복되었다.

[0098] 실시예 5 - FXa<sup>116L</sup>은 마우스 꼬리 절단 출혈 모델에서 리바록사반을 길항한다.

[0099] 생체내에서 리바록사반의 효과를 극복하는 FXa<sup>116L</sup>의 능력을 정상 마우스의 급성 출혈 모델에서 평가하였다. 결과는 자이모겐-유사 FXa 변이체가 직접적인 FXa 억제제의 항응고 효과를 역전시킬 수 있었다는 것을 입증하였다.

[0100] 출혈을 연장시킬 리바록사반의 용량을 확립하기 위해, 리바록사반의 단회 정맥내 주사를 10 mg/kg, 25 mg/kg 또는 50 mg/kg의 용량으로 수컷 C57Bl/6 마우스(더 잭슨 래보러토리(The Jackson Laboratory), 미국 메인주 바하버 소재)에게 제공하였다. 30분 후, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 가열된 플랫폼 상에 배치하고, 꼬리 절단 전 마우스의 체온을 37℃로 유지하였다. 꼬리를 37℃에서 50 ml의 예비가온된 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 2분 동안 침지시켰다. 3 mm 꼬리 절단을 수행하고 혈액을 10분 동안 PBS 내로 채취하였다. PBS 내로 채취된 혈액의 헤모글로빈 함량으로 채혈의 양의 정량적 평가를 결정하였다. 튜브를 원심분리하여 적혈구를 수집하고 5 ml 용해 완충제(8.3 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 g/l KHCO<sub>3</sub> 및 0.037 g/l EDTA)에 재현탁하고, 샘플의 흡광도를 575 nm에서 측정하였다. 표준 곡선을 이용하여 흡광도 값을 총 혈액 손실( $\mu$ l)로 전환시켰다. 리바록사반의 투여는 꼬리 절단 후 혈액 손실의 용량 의존적 증가를 야기하였다(도 11).

[0101] 이 모델에서, 50 mg/kg 용량의 리바록사반은 꼬리 절단 후 혈액 손실의 증가를 야기하였다. 50 mg/kg의 리바록사반을 마우스에게 투약하고, 30분 후 50 또는 200  $\mu$ g/kg의 FXa<sup>116L</sup>을 꼬리 절단 전 37℃에서 정맥내로 투약하였다. 그 다음, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 가열된 플랫폼 상에 배치하고, 꼬리 절단 전 마우스의 체온을 37℃로 유지하였다. 꼬리를 37℃에서 50 ml의 예비가온된 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 2분 동안 침지시켰다. 3 mm 꼬리 절단을 수행하고, 혈액을 10분 동안 PBS 내로 채취하고, 전술된 바와 같은 헤모글로빈 함량으로 출혈의 양의 평가를 결정하였다. 이 모델에서, 지혈 FXa<sup>116L</sup> 변이체의 투여는 리바록사반에 의해 유도된 과도한 출혈 손실을 감소시켰다(도 11).

[0102] 실시예 6 - 생체 현미경관찰을 이용하여 입증하였을 때 FXa<sup>116L</sup>은 마우스 출혈 모델에서 리바록사반을 길항한다.

[0103] 생체 현미경관찰을 이용하여 가시화하였을 때, 리바록사반은 레이저에 의해 유도된 손상 후 마우스 고환거근의 미세순환에서 혈전 형성을 억제하는 것으로 입증되었다. FXa<sup>116L</sup>의 추가 투여는 이 시스템에서 리바록사반의 항응고 효과를 길항할 수 있었다.

[0104] 표준 기법을 이용하여 마우스의 고환거근을 노출시키고 생체 현미경관찰을 이용하여 가시화하였다. 그 다음, 레이저를 이용하여 상기 근육에서 혈관 손상을 유도하였다. 손상 후, 피브린 및 혈소판을 특이적으로 인식하는 상이한 형광 표지된 항체들을 사용하여 응괴 형성을 가시화하였다. 응고는 상기 두 종류의 항체들로부터의 형광 신호의 존재에 의해 표시된다.

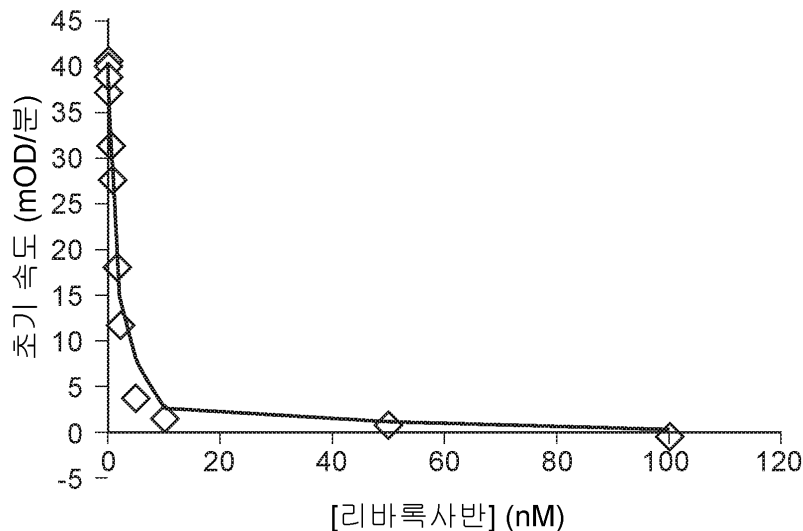
[0105] 레이저 손상 후, 비처리된 마우스는 수분 동안 안정한 응괴를 손상 부위에서 신속하게 형성하였다(도 13A). 비디오 프레임에서, 응괴는 피브린 및 혈소판에 대한 항체들과 관련된 형광 신호의 공존으로서 가시화된다(보다 더 어두운 회색 영역과 중첩되는 밝은 회색 중심 영역). 그러나, 마우스에게로의 1 mg/kg 리바록사반의 투여는 손상 부위에서 혈소판의 축적을 지연시켰고 피브린의 임의의 신호를 제거하였다(도 13B). 비디오 프레임에서, 감소된 정도의 혈소판만이 항-혈소판 항체와 관련된 형광 신호의 존재를 반영하는 어두운 회색 영역에 의해 표시된 바와 같이 관찰될 수 있다. 대조적으로, 마우스가 1 mg/kg 리바록사반에 이어서 0.5 mg/kg FXa<sup>116L</sup>을 투여 받은 경우, 응괴는 손상 부위에서 신속히 형성되었다(도 13C). 비디오 프레임에서, 응괴는 혈소판 및 피브린에 대한 항체와 관련된 형광 신호의 특징적인 패턴에 의해 표시된다.

[0106] 본원에서 달리 정의되어 있지 않은 한, 본 개시내용과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥에 의해 달리 요구되지 않은 한, 단수형 용어는 복수형을 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학, 및 혼성화와 관련하여 사용된 명명법 및 이들의 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 명명법 및 기법이다.

- [0107] 달리 표시되어 있지 않은 한, 본 개시내용의 방법들 및 기법들은 일반적으로 당분야에서 잘 공지되어 있고 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 다양한 일반 참고문헌 및 보다 구체적인 참고문헌에 기재되어 있는 보편적인 방법들에 따라 수행된다. 예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sambrook J. & Russell D., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)); 문헌(Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002)); 문헌(Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998)); 및 문헌(Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003))을 참조한다. 효소 반응 및 정제 기법은 당분야에서 통상적으로 달성되거나 본원에 기재된 바와 같이 제조자의 설명서에 따라 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의학 및 약품 화학과 관련하여 사용된 명명법, 및 이들의 실험 절차 및 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 명명법, 및 실험 절차 및 기법이다.
- [0108] 본원에서 인용된 모든 공개문헌들, 특허들, 특허출원들 또는 다른 문헌들은 각각의 개별 공개문헌, 특허, 특허출원 또는 다른 문헌이 모든 목적을 위해 참고로 도입되는 것으로 개별적으로 표시되어 있는 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체로서 본원에 참고로 도입된다.
- [0109] 본 명세서 및 특허청구범위 전체에서 용어 "포함한다" 또는 이의 어미변화, 예컨대, "포함하고" 또는 "포함하는"은 언급된 정수 또는 정수 군의 포함을 함축하되, 임의의 다른 정수 또는 정수 군을 배제하지 않는 것으로 이해될 것이다

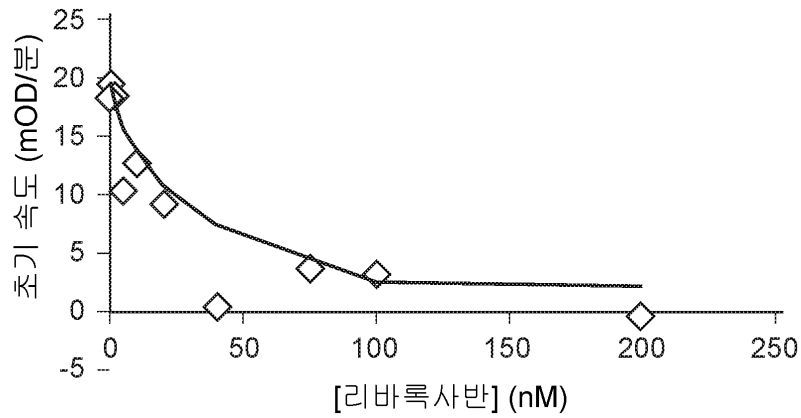
## 도면

### 도면1a

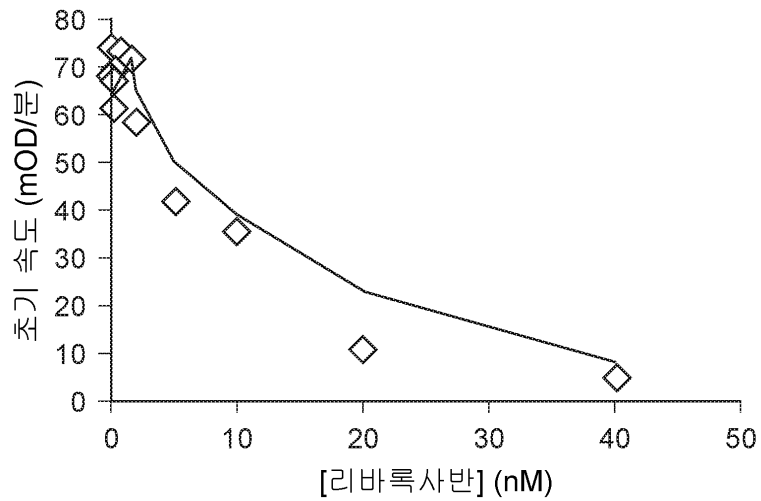




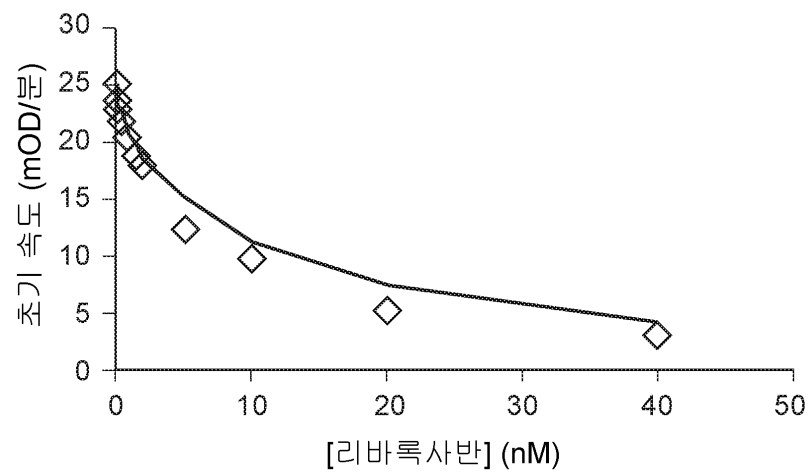
도면1b



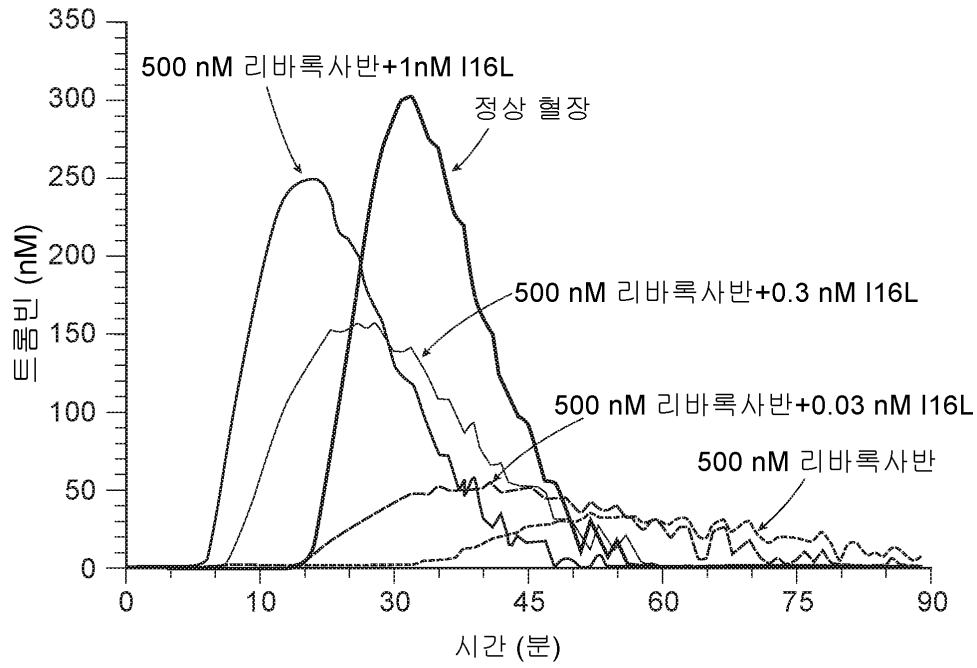
도면2a



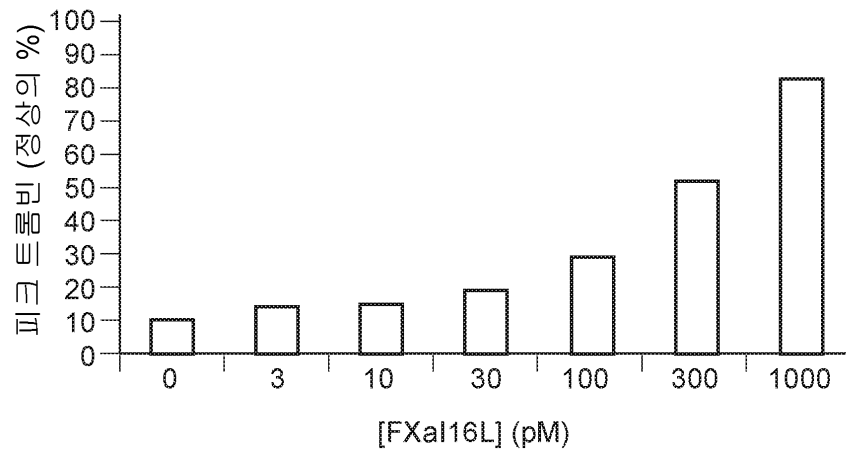
도면2b



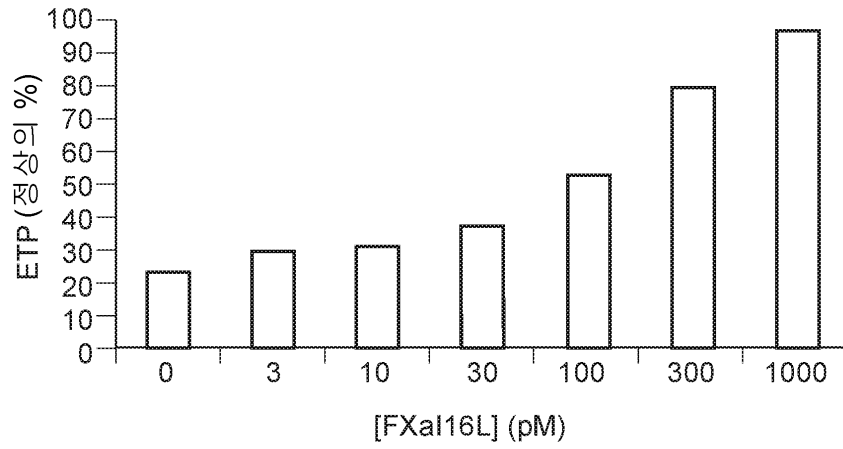
도면3



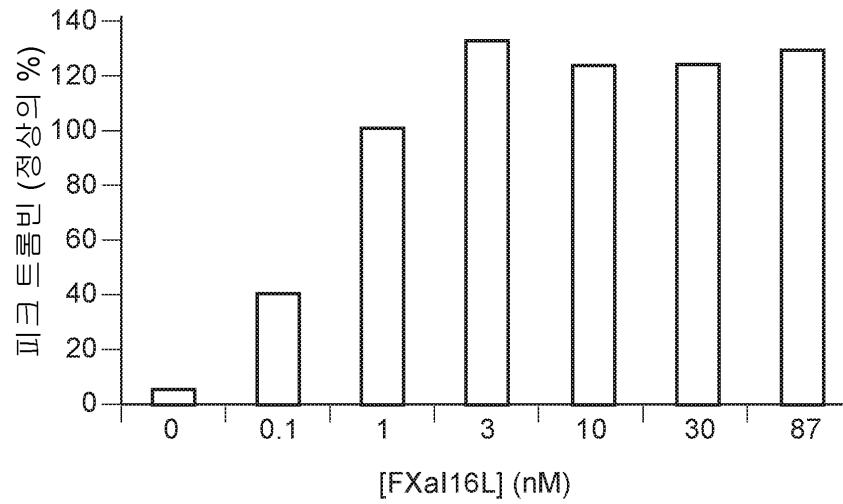
도면4a



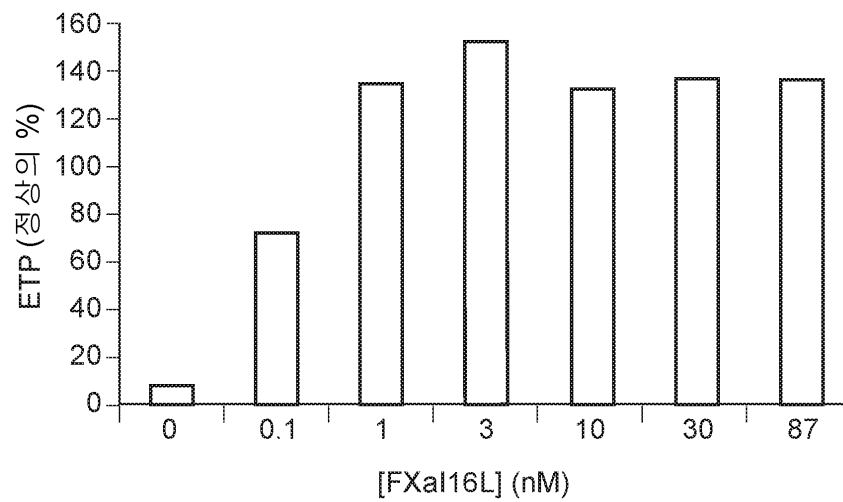
도면4b



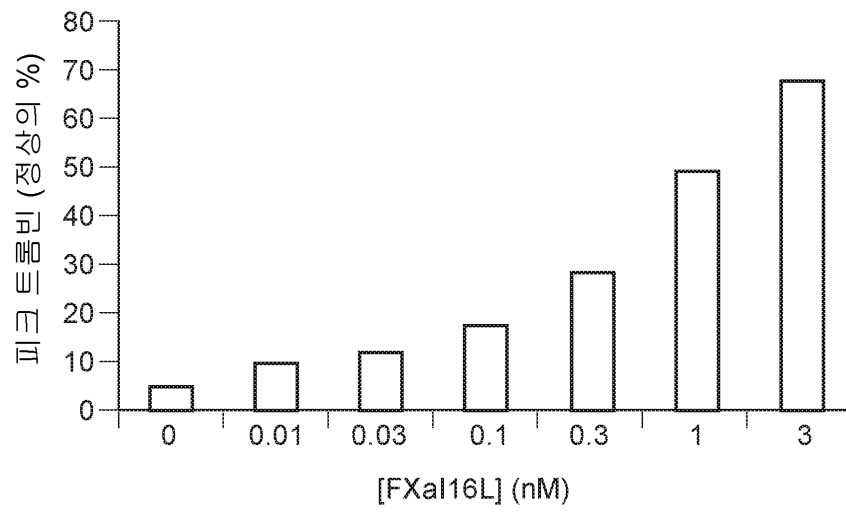
도면4c



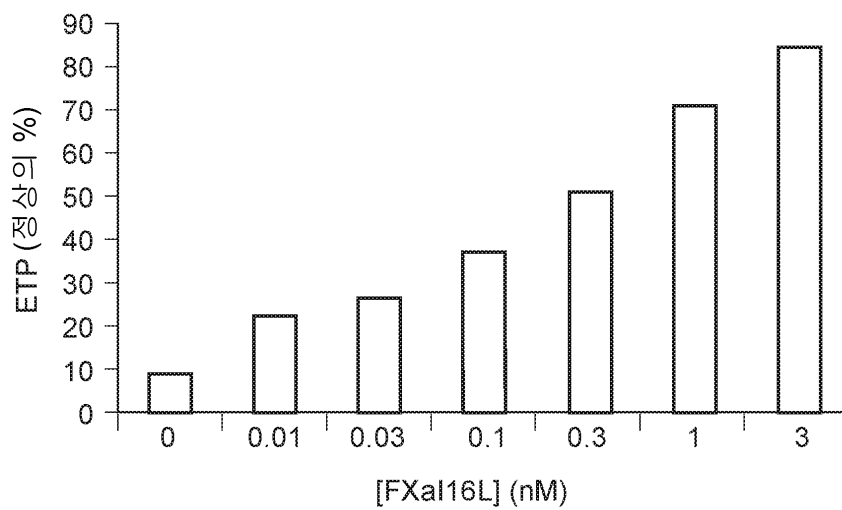
도면4d



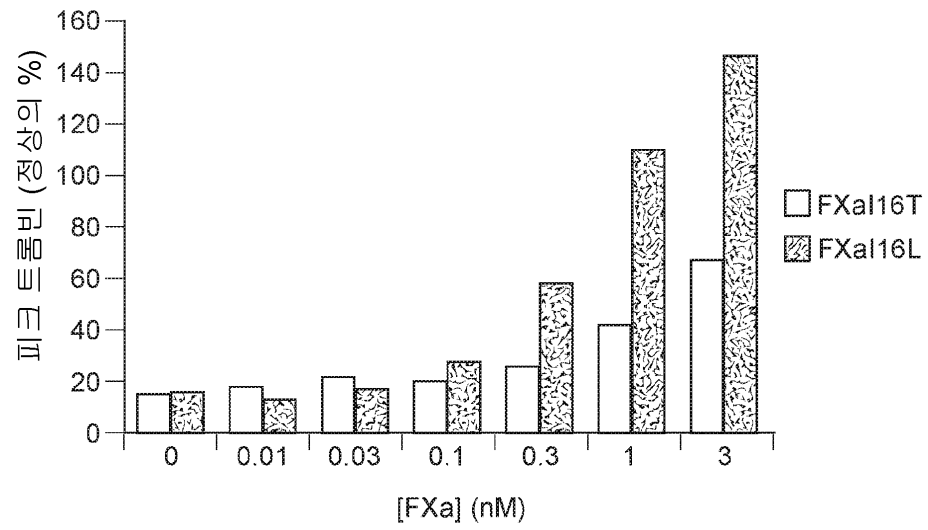
도면5a



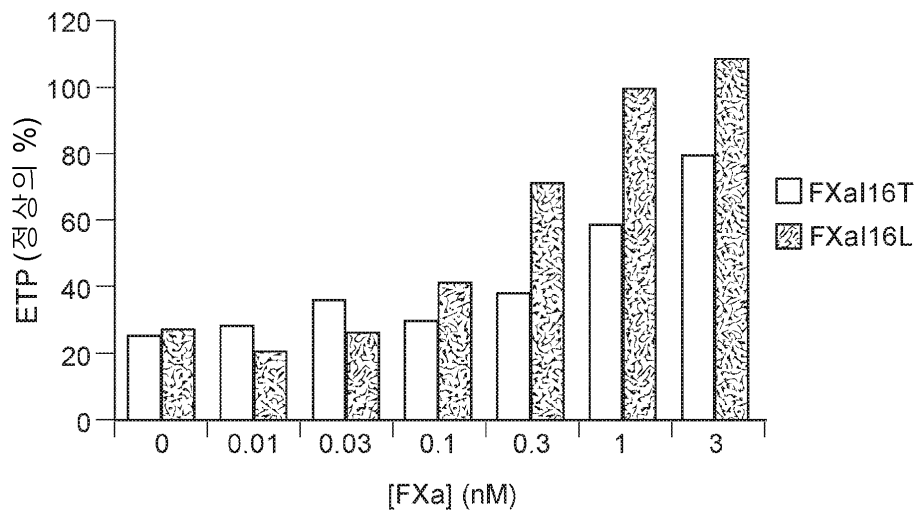
도면5b



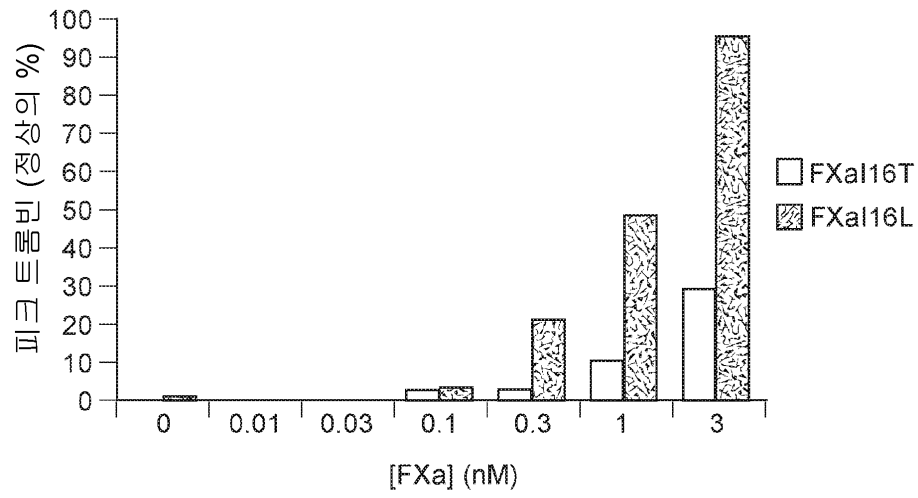
도면6a



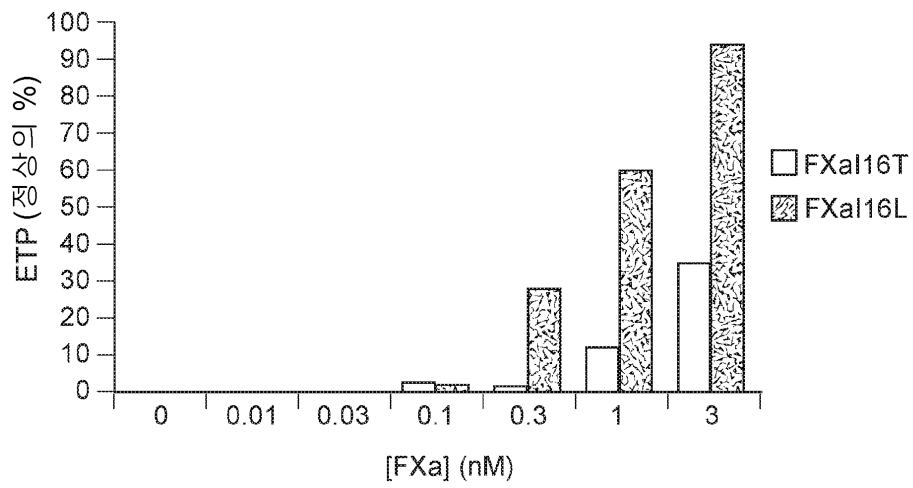
도면6b



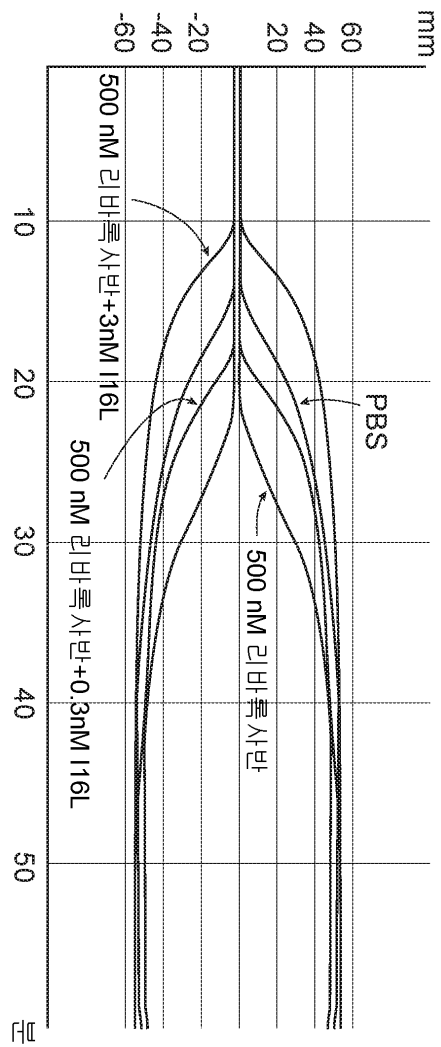
도면7a



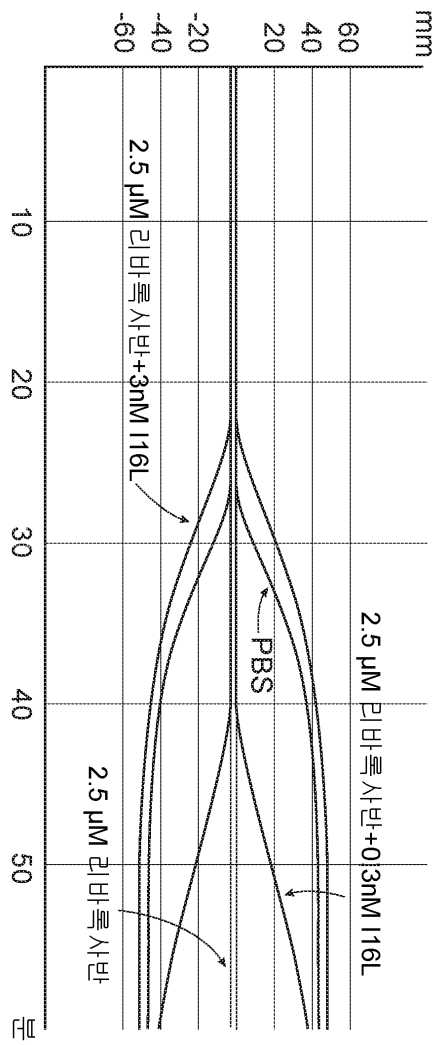
도면7b



도면8a

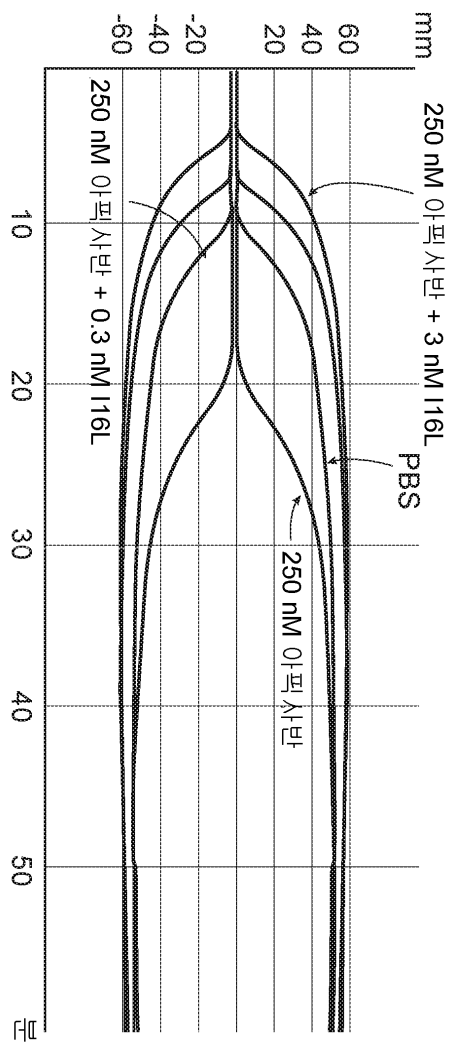


도면8b

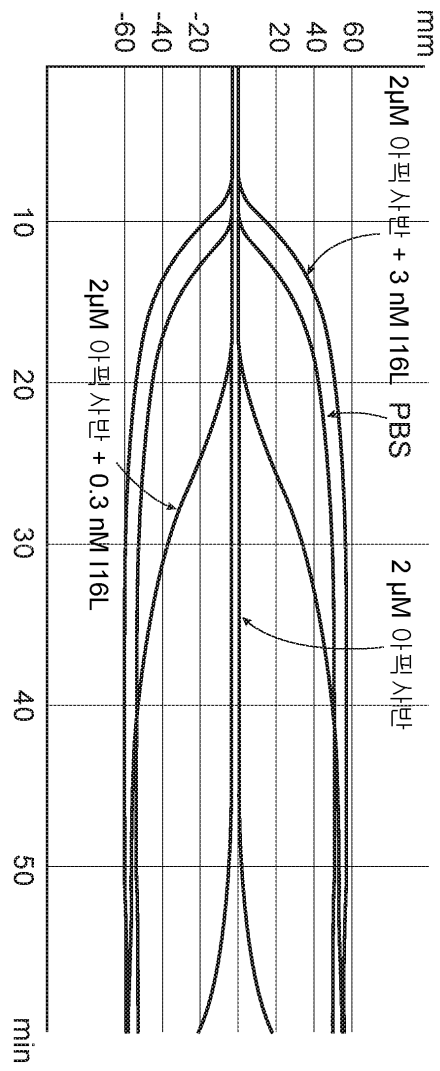




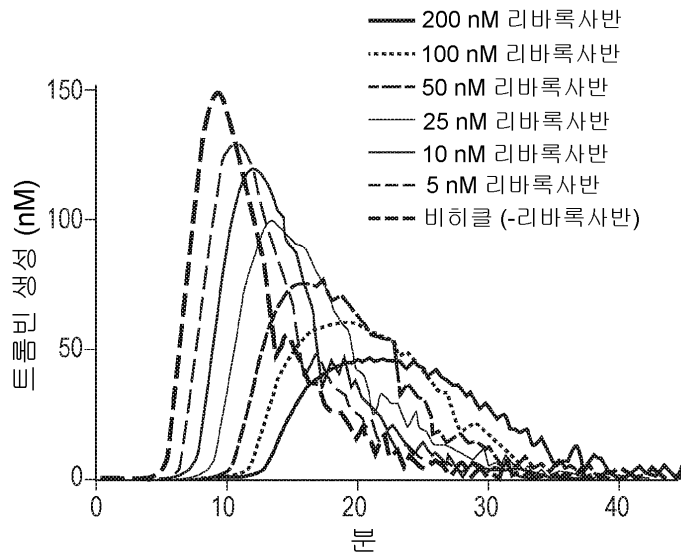
도면9a



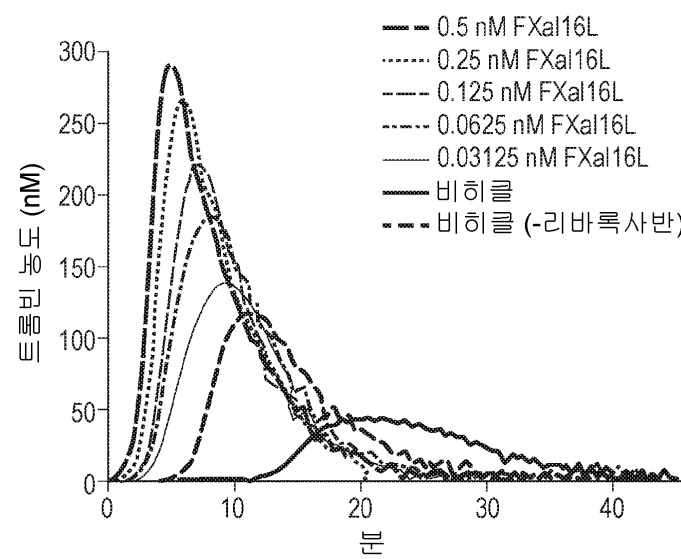
도면9b



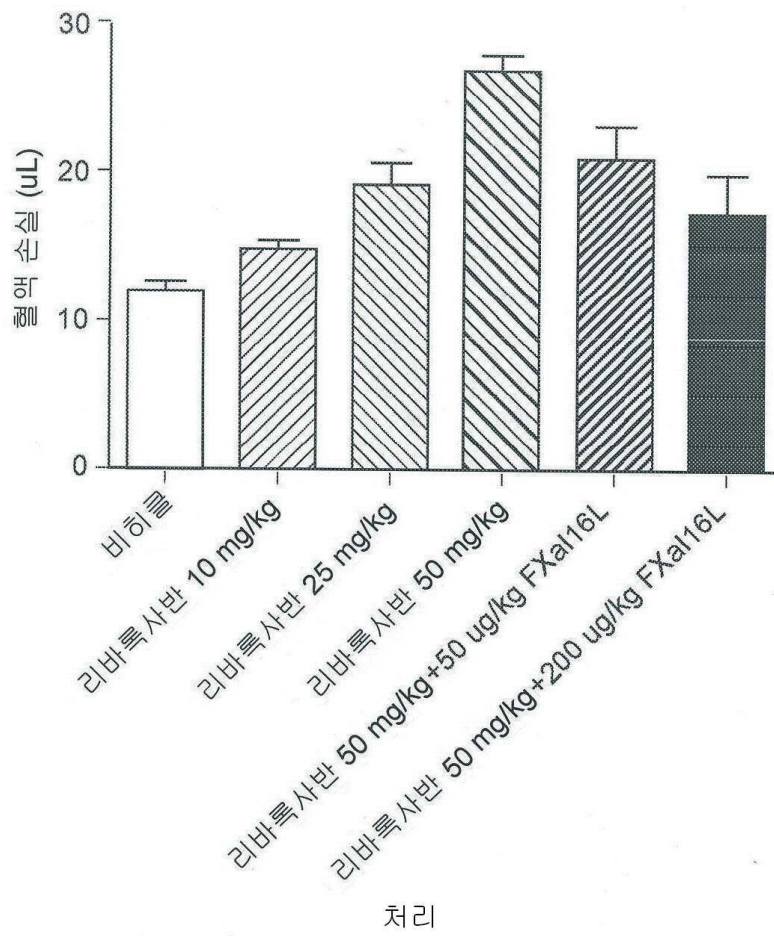
도면10a



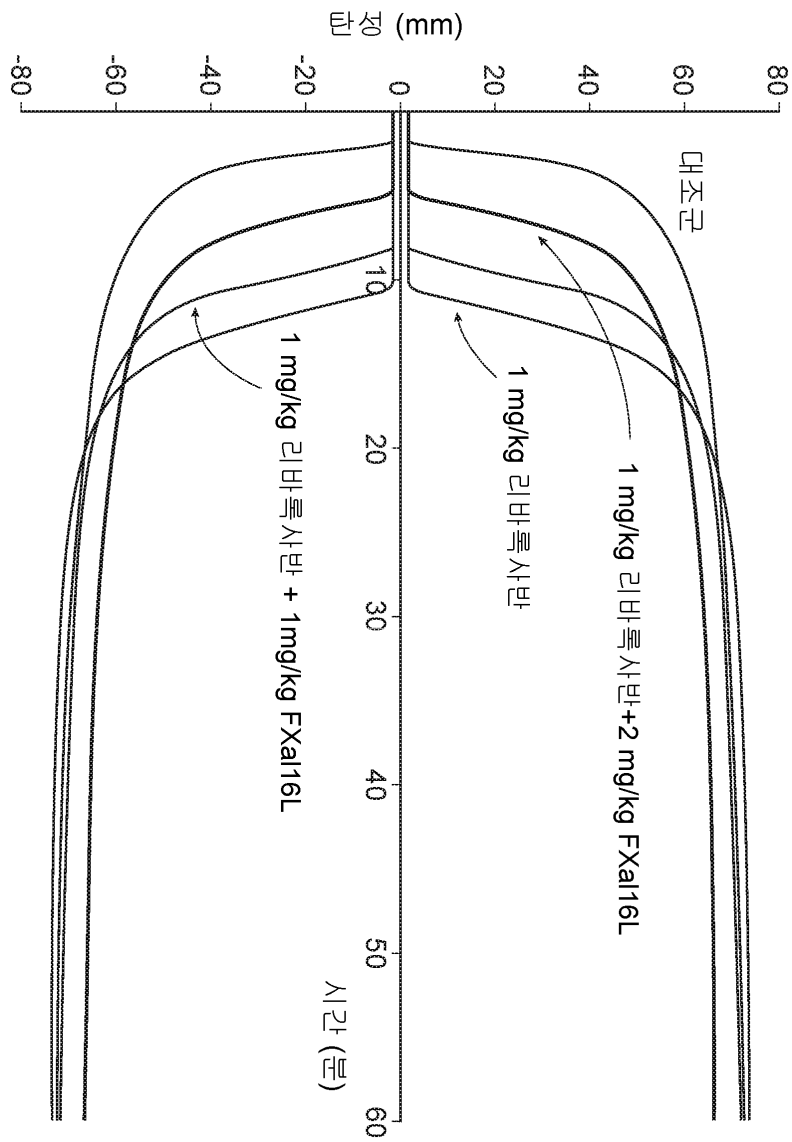
도면10b



도면11

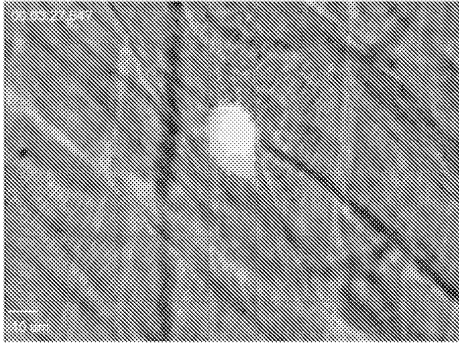


도면12

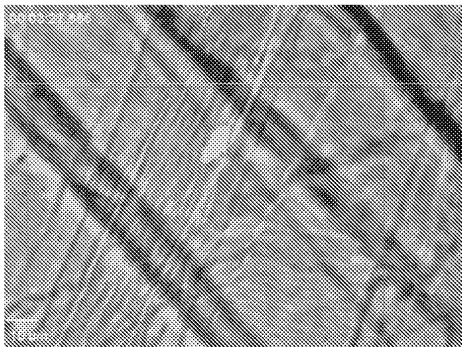


도면13

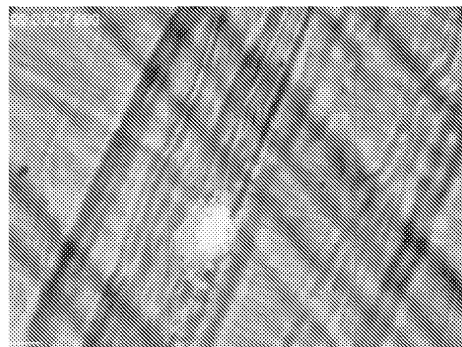
A



B



C



인간 인자 X 전구단백질 (서열번호 1)

1 MGRPLHLVLL SASLAGLLL GESLFIREQ ANNIARVTR ANSFLEEMK GHIERCEME  
61 TCSYEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGDC ETSPCQNGK CKDGLGEYTC TLEGFEGKN  
121 CELFTRKLC LDNGDCDQFC HEEQNSVVC CARGYTLADN GKACIPTGPY PCGQTLER  
181 KRVAQATSS SGAPDSITW KPYDADLDP TENPFDLDF NQTPERGDN NLRIYGGQE  
241 CKDGECPWQA LLINENEGF CGGTLSEFY ILTAHCLYQ AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE  
301 AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDI AVLRLKT PIFRMNVAP ACLPERDWA STIMTQKTGI  
361 VSGFGRTHEK GRQSTRKML EVPYVDRNSC KSSSFITQ NMFQAGYDTK QEDACQGDG  
421 GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGYG IYTKVTAFK WIDRSMKTRG LPAKSHAPE  
481 VITSSPLK

도면14



도면15

인간 인자 X 전구단백질 (서열번호 2)

```

1  GACTTTGCTC CAGCAGCCTG TCCCAGTGAG GACAGGGACA CAGTACTCGG CCACACCATG
61  GGGCGCCAC TGCACCTCGT CCTGCTCAGT GCCTCCCTGG CTGGCCTCCT GCTGCTCGGG
121  GAAAGTCTGT TCATCCGCAG GGAGCAGGCC AACAAATCC TGGCGAGGGT CACGAGGGCC
181  AATTCTTTC TTGAAGAGAT GAAGAAAGGA CACCTCGAAA GAGAGTGCAT GGAAGAGACC
241  TGCTCATACG AAGAGGCCCG CGAGGTCTTT GAGGACAGCG ACAAGACGAA TGAATTCTGG
301  AATAAATACA AAGATGGCGA CCAGTGTGAG ACCAGTCCTT GCCAGAACCA GGGCAAATGT
361  AAAGACGGCC TCGGGGAATA CACCTGCACC TGTTTAGAAG GATTCTGAAG CAAAACTGT
421  GAATTATTC CACGGAAGCT CTGCAGCCTG GACAAACGGG ACTGTGACCA GTTCTGCCAC
481  GAGGAACAGA ACTCTGTGGT GTGCTCCTGC GCCCGCGGGT ACACCCTGGC TGACAACGGC
541  AAGGCCTGCA TTCCCACAGG GCCCTACCCC TGTGGGAAAC AGACCCTGGA ACGCAGGAAG
601  AGGTCAGTGG CCCAGGCCAC CAGCAGCAGC GGGGAGGCC CTGACAGCAT CACATGGAAG
661  CCAIATGATG CAGCCGACCT GGACCCACC GAGAACCCTT TCGACCTGCT TGACTTCAAC
721  CAGACGCAGC CTGAGAGGGG CGACAACAAC CTCACCAGGA TCGTGGGAGG CCAGGAATGC
781  AAGGACGGGG AGTGTCCCTG GCAGGCCCTG CTCATCAATG AGGAAAACGA GGGTTTCTGT
841  GGTGGAACCA TTCTGAGCGA GTTCTACATC CTAACGGCAG CCCACTGTCT CTACCAAGCC
901  AAGAGATTCA AGGTGAGGGT AGGGGACCGG AACACGGAGC AGGAGGAGGG CGGTGAGGCG
961  GTGCACGAGG TGGAGGTGGT CATCAAGCAC AACCGGTTCA CAAAGGAGAC CTATGACTTC
1021  GACATCGCCG TGCTCCGGCT CAAGACCCCC ATCACCTTCC GCATGAACGT GGCGCCTGCC
1081  TGCCTCCCCG AGCGTGACTG GGCCGAGTCC ACGCTGATGA CGCAGAAGAC GGGGATTGTG
1141  AGCGGCTTCG GGCGCACCCA CGAGAAGGGC CGGCAGTCCA CCAGGCTCAA GATGCTGGAG
1201  GTGCCCTACG TGGACCGCAA CAGCTGCAAG CTGTCCAGCA GCTTCATCAT CACCCAGAAC
1261  ATGTTCTGTG CCGGCTACGA CACCAAGCAG GAGGATGCCT GCCAGGGGGA CAGCGGGGGC
1321  CCGCACGTCA CCGCTTCAA GGACACCTAC TTCGTGACAG GCATCGTCAG CTGGGGAGAG
1381  GGCTGTGCCC GTAAGGGGAA GTACGGGATC TACACCAAGG TCACCGCCTT CCTCAAGTGG
1441  ATCGACAGGT CCATGAAAAC CAGGGGCTTG CCCAAGGCCA AGAGCCATGC CCCGGAGGTC
1501  ATAACGTCTT CTCCATTAAA GTGAGATCCC ACTCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> PFIZER INC.  
THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR COUNTERACTING FACTOR XA INHIBITION
- <130> PC072006A
- <140> PCT/IB2014/058494
- <141> 2014-01-23
- <150> US 61/759,332
- <151> 2013-01-31
- <160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 488

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn  
20 25 30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met  
35 40 45

Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr  
50 55 60

Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe  
65 70 75 80

Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln  
85 90 95

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys  
100 105 110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu  
115 120 125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln  
130 135 140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn  
145 150 155 160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr  
165 170 175

Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly  
180 185 190

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu

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

Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg  
450 455 460

Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu  
465 470 475 480  
Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
485

<210> 2

<211> 1560

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gactttgctc cagcagcctg tcccagttag gacagggaca cagtactcgg ccacaccatg	60
gggcgcccac tgcacctcgt cctgctcagt gcctccctgg ctggcctcct gctgctcggg	120
gaaagtctgt tcatccgcag ggagcaggcc aacaacatcc tggcgagggt cacgagggcc	180
aattcctttc ttgaagagat gaagaaagga cacctcgaaa gagagtgcac ggaagagacc	240
tgctcatatg aagaggcccg cgaggctctt gaggacagcg acaagacgaa tgaattctgg	300
aataaatata aagatggcga ccagtgtgag accagtcctt gccagaacca gggcaaatgt	360
aaagacggcc tcggggaata cacctgcacc tgtttagaag gattcgaagg caaaaactgt	420
gaattattca cacggaagct ctgcagcctg gacaacgggg actgtgacca gttctgccac	480
gaggaacaga actctgttgt gtgctcctgc gcccgcggtt acaccctggc tgacaacggc	540
aaggcctgca tteccacagg gccctacccc tgtgggaaac agaccctgga acgcaggaag	600
aggtcagttg cccaggccac cagcagcagc ggggaggccc ctgacagcat cacatggaag	660
ccatattgat cagccgacct ggacccccacc gagaaccctt tcgacctgct tgacttcaac	720
cagacgcagc ctgagagggg cgacaacaac ctaccagga tcgtgggagg ccaggaatgc	780
aaggacgggg agtgtccctg gcaggccctg ctcatcaatg aggaaaacga gggtttctgt	840
ggtggaacca ttctgagcga gttctacatc ctaacggcag cccactgtct ctaccaagcc	900
aagagattca aggtgagggt aggggaccgg aacacggagc aggaggaggg cggtagggcg	960
gtgcacgagg tggaggttgt catcaagcac aaccggttca caaaggagac ctatgacttc	1020
gacatgcgag tgctccggct caagaccccc atcaccttcc gcatgaacgt ggcgccctgcc	1080
tgctccccc agcgtgactg ggccgagtc acgctgatga cgcagaagac ggggattgtg	1140
agcggcttcg ggcgaccca cgagaagggc cggcagtcga ccaggctcaa gatgctggag	1200

gtgccctacg tggaccgcaa cagctgcaag ctgtccagca gtttcatcat caccagaac 1260  
 atgttctgtg ccggtctaga caccaagcag gaggatgcct gccaggggga cagcgggggc 1320  
 ccgcacgtca ccgcttcaa ggacacctac ttctgtacag gcatcgtcag ctggggagag 1380  
 ggctgtgccc gtaaggggaa gtacgggatc tacaccaagg tcaccgcctt cctcaagtgg 1440  
 atcgacaggt ccatgaaaac caggggcttg cccaaggcca agagccatgc cccggaggtc 1500

ataacgtcct ctccattaaa gtgagatccc actcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Proteolytic Cleavage Site

<400> 3

Arg Lys Arg Arg Lys Arg

1 5