

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/48

A61P 7/04

/(A61K38/48,38 : 37)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02818539.0

[43] 公开日 2004 年 12 月 22 日

[11] 公开号 CN 1556710A

[22] 申请日 2002.7.19 [21] 申请号 02818539.0

[30] 优先权

[32] 2001.7.20 [33] DK [31] PA200101127

[86] 国际申请 PCT/DK2002/000505 2002.7.19

[87] 国际公布 WO2003/007983 英 2003.1.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.22

[71] 申请人 诺沃挪第克健康护理股份公司

地址 瑞士苏黎世

[72] 发明人 拉斯马斯·罗杰克杰尔

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 42 页 附图 2 页

[54] 发明名称 含有因子 VII 多肽和因子 XI 多肽的药用组合物

[57] 摘要

本发明涉及含有因子 VII 或因子 VII - 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的组合物, 及其用于治疗出血发作的用途。

ISSN 1008-4274

1. 含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽, 和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的药用组合物。
- 5 2. 根据权利要求 1 的组合物, 其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII 相关性多肽。
3. 根据权利要求 2 的组合物, 其中所述的因子 VII-相关性多肽是因子 VII 的氨基酸序列变异体。
4. 根据权利要求 2 或 3 的组合物, 其中当在本说明书所述的“体外水解
- 10 10 试验”中检测时所述的因子 VII 相关性多肽的活性与天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之间的比率是至少大约 1.25。
5. 根据权利要求 1 的组合物, 其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII。
6. 根据权利要求 5 的组合物, 其中所述的因子 VII 是人因子 VII。
- 15 7. 根据权利要求 6 的组合物, 其中所述的因子 VII 是重组人因子 VII。
8. 根据权利要求 1-7 任一项的组合物, 其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是其活化形式。
9. 根据权利要求 8 的组合物, 其中所述的因子 VII 是重组人因子 VIIa。
10. 根据权利要求 1-9 任一项的组合物, 其中所述的因子 XI 或因子 XI
- 20 20 相关性多肽是因子 XI 相关性多肽。
11. 根据权利要求 10 的组合物, 其中所述的因子 XI-相关性多肽是因子 XI 的氨基酸序列变异体。
12. 根据权利要求 10 或 11 的组合物, 其中当在本说明书所述的“FXI 产
- 25 25 色试验”中检测时所述的因子 XI 相关性多肽的活性与天然人血浆因子 XI(野生型 FXI)的活性之间的比率是至少大约 1.25。
13. 根据权利要求 1-9 任一项的组合物, 其中所述的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是因子 XI 多肽。
14. 根据权利要求 13 的组合物, 其中所述的因子 XI 是人因子 XI。
15. 根据权利要求 14 的组合物, 其中所述的因子 XI 是重组人血浆因子
- 30 30 XI。
16. 根据权利要求 14 的组合物, 其中所述的因子 XI 是重组人血小板因

子 XI。

17. 根据权利要求 1 至 16 任一项的组合物,其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽与所述的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以大约 100:1 至大约 1:100 (w/w 因子 VII: 因子 XI)之间的质量比存在。

5 18. 根据权利要求 1 至 17 任一项的组合物,其中该组合物还含有适合于注射或输注,特别是注射的药用上可接受的赋形剂。

19. 含有治疗出血发作的组装试剂盒,包括

f)在第一个单位剂型中的有效量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和药用上可接受的载体;

10 g)在第二个单位剂型中的有效量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品和药用上可接受的载体;和

h)含有所述第一和第二剂型的容器装置。

20. 根据权利要求 19 的试剂盒,其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII 相关性多肽。

15 21. 根据权利要求 20 的试剂盒,其中所述的因子 VII-相关性多肽是因子 VII 的氨基酸序列变异体。

22. 根据权利要求 20 或 21 的试剂盒,其中当在本说明书所述的“体外水解试验”中检测时所述的因子 VII 相关性多肽的活性与天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之间的比率是至少大约 1.25。

20 23. 根据权利要求 19 的试剂盒,其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII。

24. 根据权利要求 23 的试剂盒,其中所述的因子 VII 是人因子 VII。

25. 根据权利要求 24 的试剂盒,其中所述的因子 VII 多肽是重组人因子 VII。

25 26. 根据权利要求 19 至 25 任一项的试剂盒,其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是其活化形式。

27. 根据权利要求 26 的试剂盒,其中所述的因子 VII 是重组人因子 VIIa。

28. 根据权利要求 19 至 27 任一项的试剂盒,其中所述的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是因子 XI 相关性多肽。

30 29. 根据权利要求 28 的试剂盒,其中所述的因子 XI-相关性多肽是因子 XI 的氨基酸序列变异体。

30. 根据权利要求 28 或 29 的试剂盒, 其中当在本说明书所述的“FXI 产色试验”中检测时所述的因子 XI 相关性多肽的活性与天然人血浆因子 XI(野生型 FXI)的活性之间的比率是至少大约 1.25。

5 31. 根据权利要求 19 至 27 任一项的试剂盒, 其中所述的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是因子 XI。

32. 根据权利要求 31 的试剂盒, 其中所述的因子 XI 是人因子 XI。

33. 根据权利要求 32 的试剂盒, 其中所述的因子 XI 是重组人血浆因子 XI。

10 34. 根据权利要求 32 的试剂盒, 其中所述的因子 XI 是重组人血小板因子 XI。

35. 根据权利要求 19 至 34 任一项的试剂盒, 其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以大约 100:1 至大约 1:100 (w/w 因子 VII: 因子 XI)之间的质量比存在。

15 36. 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的组合在制备治疗受试者出血发作的药物中的用途。

37. 根据权利要求 1 至 18 任一项的组合物在制备治疗受试者出血发作的药物中的用途。

38. 根据权利要求 36 或 37 的用途, 其中该药物用于缩短凝血时间。

39. 根据权利要求 36 或 37 的用途, 其中该药物用于延长凝血溶解时间。

20 40. 根据权利要求 36 或 37 的用途, 其中该药物用于增加凝血强度。

41. 根据权利要求 36 至 40 任一项的用途, 其中该药物配制成用于注射或输注, 特别是注射。

42. 根据权利要求 36 至 41 任一项的用途, 其中出血发作是由于外伤, 或者手术, 或者血小板的计数或活性降低。

25 43. 根据权利要求 36 至 42 任一项的用途, 其中该药物是单个剂型。

44. 根据权利要求 36 至 42 任一项的用途, 其中该药物以含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品的第一单位剂型和含有因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的第二单位剂型的形式制备。

30 45. 治疗受试者出血发作的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起对治疗出血有效。

46. 缩短受试者凝血时间的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对缩短凝血时间有效。
47. 增强受试者止血的方法，该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对增强止血有效。
48. 在受试者中延长凝血溶解时间的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对延长凝血溶解时间有效。
49. 在受试者中增加凝血强度的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对增加凝血强度有效。
50. 根据权利要求 45 至 49 任一项的方法，其中因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以单个剂型给药。
51. 根据权利要求 45 至 49 任一项的方法，其中因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品的第一剂型和含有因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的第二剂型的形式给药。
52. 根据权利要求 51 的方法，其中第一剂型和第二剂型以不超过 15 分钟的时间间隔给药。
53. 含有治疗出血发作的试剂盒，包含
- a) 在一个单位的剂型中的有效量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和有效量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽和药用上可接受的载体；和
- b) 含有所述一个单位的剂型的容器装置。

含有因子 VII 多肽和因子 XI 多肽的药用组合物

5 技术领域

本发明涉及含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的药用组合物。本发明还涉及因子 VII 或因子 VII-相关性多肽与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽结合用于制备治疗患有出血发作的受试者,或预防其发作的药物中的用途。本发明还涉及治疗受试者出血发作的方法及促进受试者形成凝血的方法。本发明还涉及含有这些化合物的试剂盒。

背景技术

止血由血管壁损伤后暴露于循环血液中的组织因子(TF)与循环中以相应于大约 1% 总 FVII 蛋白质质量存在的 FVIIa 之间形成复合物来起动的。该复合物锚着于携带 TF 的细胞上并在细胞表面上将 FX 激活成 FXa 且将 FIX 激活成 FIXa。FXa 将凝血酶原激活成凝血酶,后者激活 FVIII, FV, FXI 和 FXIII。此外,在止血起始步骤中形成的有限量的凝血酶也激活血小板。在血小板上的凝血酶起作用后其形状改变并暴露其表面的带电磷脂。这种激活的血小板表面形成 FX 进一步激活和凝血酶充分产生的模板。通过在激活的血小板表面形成 FIXa-FVIIIa 复合物,使得在激活的血小板表面进一步激活 FX, 然后 FXa 仍然在该表面将凝血酶原转变成凝血酶。然后凝血酶将血纤蛋白原转变成不溶且稳定起始血小板栓塞的血纤蛋白。这一过程为区域化的,即局限于 TF 表达或暴露的位点,从而使全身性激活凝血系统的风险最小化。不溶性血纤蛋白形成的栓塞由 FXIII-催化的血纤蛋白纤维的交联进一步稳定。

FVIIa 在血浆中主要以单链酶原存在,该酶原被 FXa 裂解成其双链的活化形式,即 FVIIa。已经开发了重组活化因子 VIIa (rFVIIa)作为促止血 (pro-haemostatic)剂。在由于形成抗体而不能用凝血因子产品治疗的患有出血的血友病受试者中施用 rFVIIa,可产生迅速和高效的促止血反应。用 FVIIa 也可成功地治疗患有因子 VII 缺乏的出血受试者或具有正常凝血系统但发生过出血的受试者。在这些研究中,没有发现 rFVIIa 的不良副作用(特别是出现血栓栓塞)。

额外外源性施用 FVIIa 增加在激活的血小板表面上的凝血酶形成。这在缺乏 FIX 或 FVIII 从而丧失凝血酶充分形成的最有效途径的血友病受试者中发生。另外，在血小板数量降低或血小板具有功能缺陷的情况下，额外的 FVIIa 增加凝血酶形成。

- 5 重组人 FVIIa 的商业制品以 NovoSeven® 销售 (Novo Nordisk A/S, 丹麦)。Novoseven® 标示用于治疗血友病 A 和 B 患者的出血发作。Novoseven® 是市场上可获得的用于有效且可靠治疗出血发作的唯一重组 FVIIa。

- 10 FXI 是内源性凝血途径的组分。FXI 缺乏与特别是在具有高度局部纤维蛋白溶解活性的组织中的轻微到中度出血紊乱相关。相反，据信高水平的 FXI 是静脉血栓形成的危险因素。FXI 是被 FXIIa，凝血酶和 FXIa 激活的胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的酶原。活化的 FXI (FXIa) 参与 FIX 的激活，后者又 (与 FVIII 结合) 进一步激活 FX 且因此导致凝血酶产生。

- 15 与手术或严重外伤相关的出血过多且需要输血的受试者比没有经历任何出血的受试者形成更多的并发症是熟知的。然而，中度出血需要施用人血或血液产品 (血小板，白细胞，用于治疗凝血缺陷的血浆来源的浓缩物，等) 也可导致与传递人病毒 (肝炎，HIV，细小病毒及其它至今未知的病毒) 的危险相关的并发症。广泛出血需要大量输血可导致形成多个器官的衰竭，包括损害肺和肾功能。一旦受试者形成这些严重的并发症，涉及许多细胞因子的级联事件和炎症反应就开始，使得任何治疗都非常困难且不幸的是通常都不成功。因此，手术以及严重组织损伤治疗中的主要目标是避免或最小化出血。20 为了避免或最小化这种出血，确保形成不容易被纤维蛋白溶解酶溶解的稳定固体止血栓是重要的。而且，重要的是确保快速和有效形成该栓塞或凝血。

- 25 现在，经历出血发作的受试者，包括外伤受害者和与手术相关的出血受试者，通常用几次注射或输注 FVIIa 进行治疗，因为 FVIIa 的半寿期短 (2.5 小时) 而需要一次以上的给药来维持某一水平的止血能力。加快阻止出血对该受试者具有重要益处。终止出血和维持止血所需的给药次数的减少也是如此。

- 30 日本专利申请 59-116213A 涉及用作组织粘合剂的含有凝血剂作为活性成份的气溶胶组合物。该凝血剂可选自凝血因子 I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, 和 XIII, 前激肽释放酶, 高多聚体激肽原和凝血酶。优选 F XIII 与凝血酶的组合。

欧洲专利 225.160(Novo Nordisk)涉及 FVIIa 的组合物和用于治疗不是由凝血因子缺陷或凝血因子抑制剂引起的出血疾病的方法。

欧洲专利 82.182 (Baxter Travenol Lab.)涉及因子 VIIa 的组合物在受试者中对抗凝血因子缺陷的用途或作为抑制剂对凝血因子的影响。

5 国际专利申请 WO 93/06855(Novo Nordisk)涉及 FVIIa 的局部应用。

美国专利 5,252,217 涉及制备用于治疗用途的人因子 XI 浓缩物的方法。

本领域仍然需要对经历出血发作的受试者进行改良型治疗, 包括由以下原因引起的出血发作: 由手术, 外伤, 或其它形式的组织损伤引起; 诱导型凝血病, 包括在多次输血的受试者中的凝血病; 先天性或获得性凝血或出血疾病, 包括肝功能降低(“肝脏疾病”); 缺陷型血小板功能或血小板数目减少; 10 主要凝血“化合物”(例如, 血小板或冯.维勒布兰德因子蛋白)缺乏或异常; 纤维蛋白溶解增加; 抗凝剂疗法或溶解血栓疗法; 或干细胞移植。

本领域仍然需要改良的, 可靠的和广泛适用的方法用于增强凝血, 增强或确保形成稳定的止血栓, 或提高治疗受试者的方便性, 或在受试者, 特别 15 是凝血酶产生减少的受试者中实现完全止血。也需要降低了实现完全止血所需的 FVIIa 量的方法和缩短了阻止出血的时间的方法。

发明概述

本发明的一个目的是提供可有效用于治疗或预防出血发作和凝血疾病的 20 的组合物。

本发明的第二个目的是提供单个单位剂型的组合物, 它可有效用于治疗或预防出血发作或作为前凝血剂。本发明的另一目的是提供表现出协同效应的组合物, 治疗方法或试剂盒。

本发明的另一目的是提供表现出无显著副作用, 例如高水平的全身性激 25 活凝血系统的组合物, 治疗方法或试剂盒。

本发明的其它目的在阅读本说明书时将是显而易见的。

在第一个方面, 本发明提供了含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽, 和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的药用组合物。

在第二个方面, 本发明提供了含有治疗出血发作的部件的试剂盒, 包括 30 a)在第一个单位剂型中的有效量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和药用上可接受的载体;

b)在第二个单位剂型中的有效量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品和药用上可接受的载体; 和

c)含有所述第一和第二剂型的容器装置。

5 在其不同的实施方案中, 该试剂盒还含有有效量的 TFPI-抑制剂和/或因子 VIII; 该 TFPI-抑制剂或因子 VIII(或两者的组合)可存在于分开的单位剂型中或者可存在于含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽, 或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的一个单位剂型中。

在第三个方面, 本发明提供了因子 VII 或因子 VII 相关性多肽与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的组合在制备治疗受试者出血发作的药物中的用途。
10 在另一方面, 本发明提供了权利要求 1 至 18 任一项所述的组合物用于制备治疗受试者出血发作的药物中的用途。

在其不同的实施方案中, 该药物用于缩短凝血时间, 延长凝血溶解时间, 和增加凝血强度。

15 在另一实施方案中, 该药物配制成用于静脉内给药, 优选注射或输注, 特别是注射。

在一个实施方案中, 该药物配制成单个单位的剂型; 在另一实施方案中它配制成含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品的第一单位剂型和含有因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的第二单位剂型的形式。

20 在不同的实施方案中, 该药物用于治疗经历出血发作的受试者, 所述出血发作由以下原因引起: 手术, 外伤, 或其它形式的组织损伤; 凝血病, 包括在多次输血的受试者中的凝血病; 先天性或获得性凝血或出血疾病, 包括肝功能降低(“肝脏疾病”); 缺陷型血小板功能或血小板数目减少; 主要凝血“化合物”(例如, 血小板或冯·维勒布兰德因子蛋白)缺乏或异常; 纤维蛋白溶解增加; 抗凝剂疗法或溶解血栓疗法; 干细胞移植。在一系列的实施方案中,
25 出血发生在诸如脑, 内耳区, 眼, 肝脏, 肺, 肿瘤组织, 胃肠道的器官中; 在另一系列的实施方案中, 它是弥散型出血, 例如出血性胃炎和过多的子宫出血。在另一系列的实施方案中, 出血发作是在具有急性出血性关节炎(关节出血), 慢性血友病关节炎, 血肿, (例如肌肉, 腹膜后, 舌下和咽后)的受试者中与手术或外伤相联系的出血, 在其它组织中的出血, 血尿(肾道出血),
30 脑出血, 手术(例如, 肝切除术), 拔牙, 和胃肠出血(例如, UGI 出血)。在一个实施方案中, 该药物用于治疗受试者中由于外伤, 或手术, 或血小板计

数或活性降低引起的出血发作。

在另一方面，本发明提供了治疗受试者出血发作的方法，该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对治疗出血有效。

在另一方面，本发明提供了缩短受试者凝血时间的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对缩短凝血时间有效。

在另一方面，本发明提供了在受试者中增强止血的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对增强止血有效。

在另一方面，本发明提供了在受试者中延长凝血溶解时间的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对延长凝血溶解时间有效。

在另一方面，本发明提供了在受试者中增加凝血强度的方法，该方法包含给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII-相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品，其中第一和第二量一起对增加凝血强度有效。

在该方法的一系列实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以单个单位的剂型给药。

在另一系列的实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品的第一单位剂型和含有因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的第二单位的剂型的形式给药。在其一个系列的实施方案中，第一单位剂型和第二个单位剂型以不超过 15 分钟的时间间隔给药。

在另一方面，本发明提供了含有治疗出血发作的试剂盒，包含 d) 在一个单位的剂型中的有效量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和有效量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽和药用上可接受的载体；和

e)含有所述一个单位的剂型的容器装置。

在本发明的一个系列的实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII 相关性多肽。在本发明的一个系列的实施方案中，因子 VII 相关性多肽是因子 VII 氨基酸序列变异体。在一个实施方案中，当在本说明书所述的“体外水解试验”中检测时因子 VII 相关性多肽的活性和天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之间的比率是至少大约 1.25。

在本发明的一个系列的实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII。在一个实施方案中，所述的因子 VII 是人因子 VII。在一个实施方案中，因子 VII 是牛，猪，犬，马，鼠或鲑鱼因子 VII。在另一实施方案中，因子 VII 是重组制备的。在另一实施方案中，因子 VII 来源于血浆。在一个优选的实施方案中，因子 VII 是重组人因子 VII。在本发明一个系列的实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是其活化形式。在本发明的一个优选实施方案中，因子 VII 是重组人因子 VIIa。

在一个系列的实施方案中，因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是因子 XI 相关性多肽。在一个实施方案中，因子 XI 相关性多肽是因子 XI 氨基酸序列变异体。在一个实施方案中，当在本说明书所述的“FXI 产色试验”中检测时所述的因子 XI 相关性多肽的活性和天然人血浆因子 XI(野生型 FXI)的活性之间的比率是至少大约 1.25。在一个实施方案中，因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是因子 XI 多肽。在一个实施方案中，因子 XI 是人因子 XI。在一个实施方案中，因子 XI 是牛，猪，犬，马，鼠或鲑鱼因子 XI。在一个优选的实施方案中，因子 XI 是重组制备的。在另一实施方案中，因子 XI 来源于血浆。在另一实施方案中，因子 XI 是血小板衍生的因子 XI。在一个优选的实施方案中，因子 XI 是重组人血浆因子 XI。在本发明一个系列的实施方案中，因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是其活化形式。在一个实施方案中，因子 XI 相关性多肽是因子 XI 的片断。在一个实施方案中，因子 XI 相关性多肽是杂合因子 XI 多肽，例如猪/人杂合体。在一个实施方案中，因子 XI 是人血浆活化因子 XI (FXIa)。

在一个实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以大约 100:1 到大约 1:100(w/w 因子 VII: 因子 XI)之间的质量比存在。

在一个实施方案中，因子 VII 相关性多肽是与野生型因子 VII 相比具有

不超过 20 个氨基酸取代, 缺失或插入的氨基酸序列变异体(即, 具有美国专利号 4,784, 950 中公开的氨基酸序列的多肽)。在另一实施方案中, 因子 VII 变异体具有不超过 15 个氨基酸的取代, 缺失或插入; 在另一实施方案中, 因子 VII 变异体与野生型因子 VII 相比具有不超过 10 个氨基酸(例如 8, 6, 5, 5, 或 3 个氨基酸)的取代, 缺失或插入。在一实施方案中, 因子 VII 变异体选自 L305V-FVIIa, L305V/M306D/D309S-FVIIa, L305I-FVIIa, L305T-FVIIa, F374P-FVIIa, V158T/M298Q-FVIIa, V158D/E296W/M298Q-FVIIa, K337A-FVIIa, M298Q-FVIIa, V158D/M298Q-FVIIa, L305V/K337A-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVIIa, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, 和 S336G-FVII。

在另一实施方案中, 因子 VII 相关性多肽与天然人凝血因子 VIIa 相比具有增加的不依赖于组织因子的活性。在另一实施方案中, 该活性增加并不伴随着底物特异性的改变。在本发明的另一实施方案中, 因子 VII 相关性多肽与组织因子的结合不减少且因子 VII 相关性多肽与组织因子结合时至少具有野生型因子 VIIa 的活性。

在一个优选的实施方案中, 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是重组人因子 VIIa 和重组人血浆因子 XI 或重组人因子 VIIa 和重组人血浆因子 XIa。

在一个实施方案中, 哺乳动物血液中的凝血时间缩短。在另一实施方案中, 哺乳动物血液中的止血增强。在另一实施方案中, 哺乳动物血液中的凝血溶解时间延长。在另一实施方案中, 哺乳动物血液中的凝血强度提高。在一个实施方案中, 哺乳动物血液是人血。在另一实施方案中, 哺乳动物血液是正常人血; 在一个实施方案中, 该血液是来自具有凝血酶产生减少的受试者的血液。在一个实施方案中, 血液是来自具有一种或多种凝血因子缺陷的受试者的血液; 在另一实施方案中, 血液是来自具有针对一种或多种凝血因子的抑制剂的受试者的血液; 在一个实施方案中, 血液是来自具有血纤蛋白原浓度降低的受试者的血液; 在一个实施方案中, 血液是因子 XI 缺乏的人血。在一个系列的实施方案中, 血液是血浆。

在一个实施方案中, 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子

XI 相关性多肽在正常人血浆中延长了体外凝血的溶解时间。在另一实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽提高了正常人血浆中的体外最大凝血强度凝血溶解时间。在另一实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽缩短了正常人血浆的体外凝血时间。

5 在本发明的一个实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI-相关性多肽是该组合物中所包含的唯一的止血剂。在另一实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是该组合物中所包含的唯一的活性止血剂。在另一实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是给受试者施用的唯一的凝血因子。在本发明的一个实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽是给患者施用的唯一的活性剂。在一个实施方案中，该组合物基本上无凝血酶原；在另一实施方案中，该组合物基本上无 FX；在另一实施方案中，该组合物基本上无 FXa。

10 在另一实施方案中，该药物组合物配制成用于静脉给药，优选注射或输注，特别是注射。在一个实施方案中，该组合物含有至少一种药用上可接受的赋形剂或载体。

在本发明的一个实施方案中，该组合物是单个单位剂型，其中单个单位剂型含有两种凝血因子。在本发明的一个实施方案中，该组合物是组装试剂盒形式，其中含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品作为第一单位剂型和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品作为第二单位的剂型，且包含容器装置用于容纳所述第一和第二单位剂型。在一个实施方案中，该组合物或试剂盒可按需进一步含有分别施用该组合物或分开组分的说明书。

15 在本发明的一个实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以单个剂型给药。在本发明的一个实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI-相关性多肽以含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品的第一单位剂型和含有因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品的第二单位剂型的形式给药。

20 在本发明的一个实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽同时给药。在另一实施方案中，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽依次给药。在一个实施方案中，

因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以不超过 15 分钟, 优选 10, 更优选 5, 更优选 2 分钟的时间间隔给药。在一个实施方案中, 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以高达 2 小时, 优选 1 到 2 小时, 更优选高达 1 小时, 更优选 30 分钟到 1 小时, 更优选高达 30 分钟, 更优选 15 到 30 分钟的时间间隔给药。

在一个实施方案中, 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的有效量是从大约 0.05 mg/天到大约 500 mg/天(70-kg 的受试者)的量。在一个实施方案中, 因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的有效量是从大约 0.01 mg/天到大约 500 mg/天(70-kg 的受试者)。

10 在一个实施方案中, 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以大约 100:1 到大约 1:100(w/w 因子 VII:因子 XI)之间的质量比存在。

在本发明的一个实施方案中, 该药用组合物是单个剂型且基本上由因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品, 以及
15 选自药用上可接受的赋形剂或载体, 稳定剂, 去污剂, 中性盐, 抗氧化剂, 防腐剂, 和蛋白酶抑制剂中的一种或多种成份组成。

在另一实施方案中, 受试者是人; 在另一实施方案中, 受试者凝血酶产生受损; 在一个实施方案中, 受试者血纤蛋白原的血浆浓度降低(例如, 多次输血的受试者); 在一个实施方案中, 受试者因子 VII 的血浆浓度降低。

20 在另一方面, 本发明涉及在患有因子 VII 应答综合征的受试者中与该受试者用因子 VII 作为唯一凝血蛋白进行的治疗相比增强止血的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起对增强止血有效。

25 在另一方面, 本发明涉及在受试者中增强凝血酶形成的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起对增强凝血酶形成有效。

30 在另一方面, 本发明涉及在患有因子 VII 应答综合征的受试者中与该受试者用因子 VII 作为唯一凝血蛋白进行的治疗相比增强凝血酶形成的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的

制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起对增强凝血酶形成有效。

5 在另一方面, 本发明涉及, 在患有因子 VII 应答综合征的受试者中, 与该受试者施用因子 VII 作为唯一凝血因子蛋白需要的给药次数相比, 减少完成止血所需的凝血因子蛋白给药次数的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起对减少凝血因子蛋白给药次数有效。

10 在另一方面, 本发明涉及在患有因子 VII 应答综合征的受试者中治疗出血的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起对治疗出血有效。

在一个实施方案中, 因子 VII 是人重组因子 VIIa (rFVIIa)。在另一实施方案中, rFVIIa 是 NovoSeven®(Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 丹麦)。

15 在一个实施方案中, 该药用组合物配制成静脉内给药。在一个实施方案中, 该组合物还含有纤维蛋白溶解系统的抑制剂, 包括, 但不限于, 抑肽酶, ϵ -氨基己酸或氨甲环酸。在一个实施方案中, 该组合物还含有 TFPI 抑制剂和/或 FVIII。

20 在一个实施方案中, 该组合物还含有因子 VII。在一个实施方案中, 因子 VIII 是活化因子 VIII(因子 VIIIa)。在另一实施方案中, 因子 VIII 是重组因子 VIIIa。在另一实施方案中, 因子 VIII 是重组人因子 VIIIa。

在另一实施方案, 本发明涉及因子 VIIa 与因子 XI 组合在制备增强哺乳动物血浆中血纤蛋白凝血形成的药物中的用途。

25 在另一方面, 本发明涉及增强受试者中血纤蛋白凝血形成的方法, 该方法包括给需要的受试者施用第一量的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和第二量的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品, 其中第一和第二量一起在治疗出血中有效。

30 在本发明的一个实施方案中, 该药物组合物(以单个制品的形式时)基本上由因子 VIIa 和因子 XI, 和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体, 和任选一种稳定剂, 和任选一种去污剂, 和任选一种中性盐, 和任选一种抗氧化剂, 和任选一种防腐剂, 和任选一种蛋白酶抑制剂组成。

在本发明的另一实施方案中，该药物组合物(以单个制品的形式时)基本上由因子 VIIa 和因子 XI，和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体，和任选一种稳定剂，和任选一种去污剂，和任选一种中性盐，和任选一种抗氧化剂，和任选一种防腐剂，和任选一种蛋白酶抑制剂，和 TFPI 抑制剂组成。

5 在本发明的另一实施方案中，该药物组合物(以单个制品的形式时)基本上由因子 VIIa 和因子 XI，和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体，和任选一种稳定剂，和任选一种去污剂，和任选一种中性盐，和任选一种抗氧化剂，和任选一种防腐剂，和任选一种蛋白酶抑制剂，和因子 VIII，和任选一种 TFPI 抑制剂组成。

10 在另一实施方案中，该药用组合物(以试剂盒的形式时)由基本上由因子 VIIa 和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体，和任选一种稳定剂，和任选一种去污剂，和任选一种中性盐，和任选一种抗氧化剂，和任选一种防腐剂，和任选一种蛋白酶抑制剂组成的第一单位剂型，和基本上由因子 XI 和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体，和任选一种稳定剂，和任选一种去污剂，和任选一种中性盐，和任选一种抗氧化剂，和任选一种防腐剂，和任选一种蛋白酶抑制剂组成的第二单位剂型组成。

15 在另一实施方案中，该药用组合物(以试剂盒的形式时)由基本上由因子 VIIa 和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体，和任选一种稳定剂，和任选一种去污剂，和任选一种中性盐，和任选一种抗氧化剂，和任选一种防腐剂，和任选一种蛋白酶抑制剂组成的第一单位剂型，和基本上由因子 XI 和任选一种药用上可接受的赋形剂或载体，和任选一种稳定剂，和任选一种去污剂，和任选一种中性盐，和任选一种抗氧化剂，和任选一种防腐剂，和任选一种蛋白酶抑制剂组成的第二单位剂型组成；其中第一单位剂型或第二单位剂型或者两个剂型都进一步含有因子 VIII 和/或 TFPI 抑制剂。

25

附图说明

图 1:加入 FVIIa 导致凝血溶解时间的剂量依赖型延长。该效果在 10 nM FVIIa 下最佳。

图 2:在 10 nM FVIIa 存在下，加入 FXI 导致凝血溶解时间进一步延长。
30 该效果为剂量依赖型且在 30 nM FXI 下最佳。

图 3:使用凝血弹性描记法(roTEG)测量，分析 FVIIa 和 FXI 对最大凝血

硬度(MCF), 以及对 t-PA 介导的溶解的凝血抗性的影响。

图 4:这些结果证实了 FVIIa 和 FXI 加入血浆时以协同方式缩短 NHP 中的凝血时间。

5 发明详述

与手术或严重外伤相联系的过多出血且因此需要输血的受试者比没有经历任何出血的受试者形成更多的并发症。然而, 中度出血在需要给予人血或血产品(血小板, 白细胞, 用于治疗凝血缺陷的血浆来源的浓缩物, 等)的情况下也可导致并发症, 因为这与传递人病毒(例如, 肝炎, HIV, 细小病毒, 或其它至今未知的病毒)以及非病毒病原体的危险相关。广泛出血需要大量输血可导致形成多个器官的衰竭, 包括损害肺和肾功能。一旦受试者形成这些严重的并发症, 涉及许多细胞因子的级联事件和炎症反应就开始, 使得任何治疗都非常困难且不幸的是通常都不成功。经历严重失血的病人在临床上不稳定。该病人存在经历心房纤维性颤动的危险, 它可引起致命的心脏活动停止; 肾功能受损; 或肺液体外渗(也称为“湿肺”或 ARDS)。因此, 手术以及严重组织损伤治疗中的主要目标是避免或最小化出血。为了避免或最小化这种不需要的出血, 确保形成不容易被纤维蛋白溶解酶溶解的稳定固体止血栓是重要的。而且, 重要的是确保快速和有效形成该栓塞或凝血。

具有血小板减少症的受试者(血小板计数或活性降低)也具有受损的凝血酶产生以及血纤蛋白栓稳定化缺陷, 导致止血栓容易过早溶解。此外, 受到严重外伤或器官损伤且因此经常接受输血的受试者通常具有降低的血小板计数以及降低的血纤蛋白原, 因子 VIII, 和其它凝血蛋白水平。这些受试者经历受损(或降低)的凝血酶产生。因此, 这些受试者具有缺陷型, 或效率较低的止血, 导致形成容易且过早被蛋白水解酶溶解的血纤蛋白血栓, 该蛋白水解酶在以大范围外伤和器官损伤为特征的情况下进一步广泛释放。

组织出血也可导致形成血肿。血肿的大小(特别是颅间和脊柱)与神经功能的损伤程度, 康复难度, 和/或康复后神经功能永久损伤的严重性和程度密切相关。当血肿位于脑中时出现血肿的最严重后果, 它们甚至可导致患者死亡。

因此, 在出血治疗中的主要目的是在最短的时间内止血, 从而使失血保持最少。

因此本发明提供了有益的组合物，其用途和在需要治疗的受试者中治疗出血发作的治疗方法。该组合物，用途和方法与一些有益效果相关，所述效果例如止血前失血较少，手术期间需血较少，止血前血压维持在可接受的水平，血压稳定化加快，所治疗的患者恢复时间缩短，所治疗的患者康复时间缩短，包括脑中血肿的血肿形成减少或形成的血肿较小，出血的终止加快，停止出血和维持止血所需的给药次数减少。

因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品，例如因子 VIIa 与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品结合给药与单独用因子 VIIa 或因子 XI 给药时的凝血时间，凝血硬度和抗性相比提供了缩短的凝血时间，更大的凝血硬度和对纤维蛋白溶解的抗性增加。

因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品(例如因子 VIIa)与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品结合给药与单独用因子 VIIa 或因子 XI 给药时的情况相比，阻止出血所需的时间缩短，维持止血所需的给药次数减少。本发明提供了同时或依次给药因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品和因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品的有益效果。根据本发明的药用组合物可以是单个组合物的形式或者可以是多个组分的试剂盒形式(组装的试剂盒)。根据本发明的组合物在包括诸如人类的灵长类的哺乳动物中作为治疗性和预防性前凝血剂使用。本发明还提供了在包括人类的受试者中治疗(包括预防性治疗或防止)出血发作的方法。

在本说明书中无论何时提及第一或第二或第三，等，的单位剂量，它并不表示优选的给药顺序，而仅仅是为了描述方便。

因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的组合是保证凝血时间缩短，止血栓迅速形成，和形成稳定的止血栓的一种有益产品。本发明人已经发现了因子 VII 或因子 VII 相关性多肽与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的组合是保证形成坚硬，稳定和快速形成的止血栓的有益产品。

本发明人表明因子 VIIa 和因子 XI 组合比单独的因子 VIIa 或因子 XI 可更有效地缩短正常人血浆的凝血时间。还表明因子 VIIa 和因子 XI 的组合比单独的因子 VIIa 或因子 XI 可更有效地增强凝血硬度。通过将处在观察到凝血硬度不再进一步增加的浓度下的因子 VIIa 与也处在观察到凝血硬度不再进一步增加的浓度下的因子 XI 结合，意外发现凝血硬度进一步增强。还表

明了因子 VIIa 和因子 XI 组合比单独的因子 VIIa 或因子 XI 可更有效地延长正常人血浆中的体外凝血溶解时间。也表明了因子 VIIa 和因子 XI 组合比单独的因子 VIIa 或因子 XI 可更有效地延长正常人血浆中的半凝血溶解时间。还表明了因子 VIIa 和因子 XI 组合比单独的因子 VIIa 或因子 XI 可更有效地在正常人血浆中防止凝血的纤维蛋白溶解，特别是 tPA-介导的纤维蛋白溶解。

因此，通过增强凝血，可获得对受试者的出血更有效的治疗。

不希望受理论的约束，据信充分产生凝血酶是形成坚硬的，稳定的止血栓所必需的，且因此是维持止血所必需的。该血栓的血纤蛋白结构依赖于形成的凝血酶的量 and 开始产生凝血酶的速度。在凝血酶产生受损的条件下，形成高度可渗透的多孔血纤蛋白血栓。一般存在于血纤蛋白表面的纤维蛋白溶解酶容易溶解该血纤蛋白血栓。稳定的血纤蛋白血栓的形成也依赖于因子 XIIIa 的存在，因子 XIIIa 被凝血酶激活且因此也依赖于凝血酶充分产生。另外，最近描述的凝血酶激活的纤维蛋白溶解抑制剂，即 TAFI，需要相当高的凝血酶量用于其激活。因此在凝血酶形成不够充分的情况下，TAFI 不被激活，导致形成的止血栓比被正常纤维蛋白溶解活性的正常溶解更容易。在血小板数目降低的情况下，即血小板减少症，施用外源性的额外因子 VIIa 可起动更快的凝血酶产生。然而，即使在高浓度下，因子 VIIa 不能使总体凝血酶产生正常化。

在血纤蛋白原的血浆浓度降低的受试者(由于多处外伤或大范围手术多次输血的受试者)中不发生凝血酶充分激活。而通过因子 VII 和因子 XI 的联合给药获得了更有效的止血。

患有血小板减少症的受试者具有受损的凝血酶产生以及血纤蛋白血栓稳定化缺陷，导致止血栓容易过早溶解。另外，受到严重外伤或器官受损且因此经常接受输血的受试者通常具有降低的血小板计数以及降低的血纤蛋白原，因子 VIII，和其它凝血蛋白水平。这些受试者经历受损(降低)的凝血酶产生。另外，其降低的血纤蛋白原水平负向干扰因子 XIII 的激活。因此，这些受试者具有止血缺陷型，或止血效率较低，导致形成的血纤蛋白血栓容易且过早地被蛋白水解酶溶解，该蛋白水解酶在以大范围外伤和器官损伤为特征的情况下进一步被广泛释放。

为了帮助在受试者中形成具有维持止血的全部能力的充分稳定的血栓，

可施用根据本发明的组合物。该组合物在血小板数目降低的受试者和血纤蛋白原和/或其它凝血蛋白的血浆水平降低的受试者中特别有益。

在因子 XI 存在的条件下, 据信较低浓度的因子 VIIa 可足以确保充分止血。

5

因子 VII 多肽:

在实施本发明时, 可使用在预防或治疗出血中有有效的任何因子 VII 多肽。它包括来自血液或血浆, 或者以重组方式产生的因子 VII 多肽。

10 本发明包括因子 VII 多肽, 例如, 具有美国专利号 4,784,950(野生型人因子 VII)中公开的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, 因子 VII 多肽是在例如, 美国专利号 4,784,950(野生型因子 VII)中公开的人因子 VIIa。在一系列实施方案中, 因子 VII 多肽包括表现出人因子 VIIa 的特异性生物学活性的至少大约 10%, 优选至少大约 30%, 更优选至少大约 50%, 且最优选至少大约 70% 的多肽。在一系列实施方案中, 因子 VII 多肽包括表现出人因子

15 VIIa 的特异性生物学活性的至少大约 90%, 优选至少大约 100%, 优选至少大约 120%, 更优选至少大约 140%, 且最优选至少大约 160% 的多肽。在一系列实施方案中, 因子 VII 多肽包括与美国专利号 4,784,950 中公开的野生型因子 VII 的序列表现出至少大约 70%, 优选至少大约 80%, 更优选至少大约 90%, 且最优选至少大约 95% 相同性的多肽。

20 本文使用的“因子 VII 多肽”包括, 但不限于, 因子 VII, 以及因子 VII 相关性多肽。术语“因子 VII”试图包括, 但不限于, 具有野生型人因子 VII(在美国专利号 4,784,950 中公开)的氨基酸序列 1-406 的多肽, 以及来自于其它物种的野生型因子 VII, 例如牛, 猪, 犬, 鼠, 和鲑鱼因子 VII, 所述的因子 VII 来自于血液或血浆, 或者以重组方式产生。它还包括从一个个体到另一个

25 个体中存在和出现的因子 VII 的天然等位基因变异体。另外, 糖基化的程度和位置或其它翻译后修饰可根据选定的宿主细胞和宿主细胞环境的特性而变化。术语“因子 VII”也试图包括其未裂解(酶原)形式的因子 VII 多肽, 和已经被蛋白水解加工以产生其各自的生物活性形式, 且命名为因子 VIIa 的那些多肽。一般来说, 因子 VII 在残基 152 和 153 之间裂解以产生因子 VIIa。

30 “因子 VII-相关性多肽”包括, 但不限于, 相对于人因子 VII 被化学修饰和/或相对于人因子 VII 含有一个或多个氨基酸序列改变(即, 因子 VII 变异

体), 和/或相对于人因子 VII 含有截短的氨基酸序列(即, 因子 VII 片断)的因子 VII 多肽。该因子 VII 相关性多肽可相对于人因子 VII 表现出不同特性, 包括稳定性, 磷脂结合, 比活改变, 等。术语“因子 VII 相关性多肽”试图包括其未裂解(酶原)形式的该多肽, 和已经被蛋白水解加工以产生其各自的生物活性形式, 且可命名为“因子 VIIa 相关性多肽”或“活化的因子 VII 相关性多肽”的那些多肽。

本文使用的“因子 VII 相关性多肽”包括, 但不限于, 相对于野生型人因子 VII 表现出基本上相同或提高的生物学活性的多肽, 以及因子 VIIa 的生物学活性相对于野生型人因子 VIIa 的活性基本上被修饰或降低的多肽。这些多肽包括, 但不限于, 被化学修饰的因子 VII 或因子 VIIa 和导入了可修饰或破坏该多肽生物活性的特定氨基酸序列改变的因子 VII 变异体。

它还包括具有略有修饰的氨基酸序列的多肽, 例如, 具有包括 N-末端氨基酸缺失或添加的修饰的 N-末端的多肽, 和/或相对于人因子 VIIa 被化学修饰的多肽。

不论比野生型因子 VII 表现出基本上相同或更好的生物活性, 还是选择相对于野生型因子 VII 表现出基本上修饰或降低的生物学活性, 包括因子 VII 的变异体的因子 VII 相关性多肽包括, 但不限于, 具有通过一个或多个氨基酸的插入, 缺失, 或取代而不同于野生型因子 VII 序列的氨基酸序列的多肽。

因子 VII 相关性多肽(包括变异体), 涵盖了那些在上述一个或多个凝血试验, 蛋白水解试验, 或 TF 结合试验中检测时, 表现相同细胞类型中的野生型因子 VIIa 比活的至少大约 10%, 至少大约 20%, 至少大约 25%, 至少大约 30%, 至少大约 40%, 至少大约 50%, 至少大约 60%, 至少大约 70%, 至少大约 75%, 至少大约 80%, 至少大约 90%, 至少大约 100%, 至少大约 110%, 至少大约 120%, 或至少大约 130% 的多肽。

相对于野生型因子 VIIa 具有基本上相同或改进的生物学活性的因子 VII 相关性多肽(包括变异体), 涵盖了那些在上述一个或多个凝血试验, 蛋白水解试验, 或 TF 结合试验中检测时, 表现相同细胞类型中的野生型因子 VIIa 比活的至少大约 25%, 优选至少大约 50%, 更优选至少大约 75%, 更优选至少大约 100%, 更优选至少大约 110%, 更优选至少大约 120%, 且最优选至少大约 130% 的多肽。

相对于野生型因子 VIIa 具有基本上降低的生物学活性的因子 VII 相关性多肽(包括变异体)是, 在上述一个或多个凝血试验, 蛋白水解试验, 或 TF 结合试验中检测时, 表现相同细胞类型中的野生型因子 VIIa 比活的约 25% 以下, 优选约 10% 以下, 更优选约 5% 以下且最优选约 1% 以下的多肽。相

5 对于野生型因子 VII 具有基本上修饰的生物学活性的因子 VII 变异体包括, 但不限于, 表现出 TF 依赖型因子 X 蛋白水解活性的因子 VII 变异体和结合 TF 但不裂解因子 X 的那些变异体。

在一些实施方案中, 因子 VII 多肽是因子 VII 相关性多肽, 特别是变异体, 其中在“体外水解试验”(参见下文“试验”)中检测时所述的因子 VII 多肽

10 的活性和天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之间的比率是至少大约 1.25; 在其它实施方案中, 该比率为至少大约 2.0; 在其它实施方案中, 该比率是至少大约 4.0。在本发明的一些实施方案中, 因子 VII 多肽是因子 VII 相关性多肽, 特别是变异体, 其中在“体外蛋白水解试验”(参见下文“试验”)中检测

15 时所述的因子 VII 多肽的活性和天然人因子 VIIa(野生型 FVIIa)的活性之间的比率是至少大约 1.25; 在其它实施方案中, 该比率为至少大约 2.0; 在其它实施方案中, 该比率是至少大约 4.0; 在其它实施方案中, 该比率是至少大约 8.0。

在一些实施方案中, 因子 VII 多肽是在例如, 美国专利号 4,784,950(野生型因子 VII)中公开的人因子 VII。在一些实施方案中, 因子 VII 多肽是人

20 因子 VIIa。在一系列实施方案中, 因子 VII 多肽是表现出人因子 VIIa 的特异性生物学活性的至少大约 10%, 优选至少大约 30%, 更优选至少大约 50%, 且最优选至少大约 70% 的因子 VII 相关性多肽。在一些实施方案中, 因子 VII 多肽具有通过一个或多个氨基酸的插入, 缺失, 或取代而不同于野生型因子 VII 序列的氨基酸序列。

25 与野生型因子 VIIa 相比具有基本上相同或更好的生物学活性的因子 VII 变异体的非限制性例子包括, 但不限于, 在丹麦专利申请号 PA 2000 00734 和 PA 2000 01360(相应于 WO 01/83725), 和 PA 2000 01361(相应于 WO 02/22776)中所述的那些变异体。与野生型因子 VII 相比, 具有基本上相同或更高生物学活性的因子 VII 变异体的非限制性例子包括 S52A-FVII,

30 S60A-FVII (Iino 等, Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII,

F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, 和 S336G-FVII; 美国专利号 5,580,560 中公开的表现出蛋白水解稳定性增加的 FVIIa 变异体; 在残基 290 和 291 之间或残基 315 和 316 之间经蛋白水解裂解的因子 VIIa(Mollerup 等, *Biotechnol. Bioeng.* 48: 501-505, 1995); 和因子 VIIa 的氧化形式(Kornfelt 等, *Arch. Biochem. Biophys.* 363: 43-54, 1999)。相对于野生型因子 VII 具有基本上降低或修饰的生物学活性的因子 VII 变异体的非限制性例子包括 R152E-FVIIa (Wildgoose 等, *Biochem* 29: 3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama 等, *J. Biol. Chem.* 270: 66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst 等, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 15: 515-520, 1998), 和缺少 Gla 结构域的因子 VIIa(Nicolaisen 等, *FEBS Letts.* 317: 245-249, 1993)。化学修饰的因子 VII 多肽和序列变异体的非限制性例子在例如, 美国专利号 5,997, 864 中描述。

因子 VIIa 在凝血中的生物学活性来自于其(i)与组织因子(TF)结合和(ii)催化因子 IX 或因子 X 的蛋白水解裂解产生活化因子 IX 或 X(分别为因子 IXa 或 Xa)的能力。

为达到本发明的目的, 按例如美国专利号 5,997,864 所述使用因子 VII 不足的血浆和组织促凝血酶原激酶通过测量该制品促进凝血的能力可定量因子 VII 多肽的生物学活性(“因子 VII 生物学活性”)。在该试验中, 生物学活性表示为相对于对照样品凝血时间的缩短且通过与含有 1 单位/ml 因子 VII 活性的收集的人血标准比较转换成“因子 VII 单位”。另外, 因子 VIIa 的生物学活性可定量如下:

(i) 测量因子 VIIa 或因子 VIIa 相关性多肽在含有包埋于脂膜中的 TF 和因子 X 的系统中产生活化的因子 X(因子 Xa)的能力。(Persson 等, *J. Biol. Chem.* 272: 19919-19924, 1997);

(ii) 在含水系统中测量因子 X 的水解(“体外蛋白水解试验”, 见下文);

(iii) 使用基于表面胞质团共振的仪器测量因子 VIIa 或因子 VIIa 相关性多肽与 TF 的物理结合(Persson, *FEBS Letts.* 413: 359-363, 1997); 和

(iv) 测量因子 VIIa 和/或因子 VIIa 相关性多肽对合成底物的水解(“体外水解试验”, 见下文); 和

(v) 测量在不依赖于 TF 的体外系统中凝血酶的产生。

术语“因子 VII 生物学活性”或“因子 VII 活性”试图包括产生凝血酶的能力; 该术语也包括在不存在组织因子的条件下在活化的血小板表面产生凝血酶的能力。

可按照本发明使用的因子 VIIa 制品是 NovoSeven®(Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark), 而不限于此。

10 因子 XI 多肽:

在实施本发明时, 可使用在预防或治疗出血中有效的任何因子 XI 多肽。它包括来自血液或血浆, 或者以重组方式产生的因子 XI 多肽。另外, 血小板可含有 FXI 的在结构上不同的形式(可能是由于 FXI 基因的可选择的剪接)。血小板因子 XI 在 Lipscomb, M. S. & Walsh, P. N.(1979), Journal of Clinical
15 Investigation, 63, 1006-1014 中描述。

本文使用的“因子 XI 多肽”包含, 但不限于, 因子 XI, 以及因子 XI 相关性多肽。术语“因子 XI”试图包含, 但不限于, 具有在 Sun, Y. & Gailani, D.(1996), J. Biol. Chem. 271: 29023-29028(野生型人因子 XI, 血浆)中所述的氨基酸序列的多肽, 以及来自于其它物种的野生型因子 XI, 例如, 牛, 猪,
20 犬, 鼠, 和鲑鱼因子 XI。在一些实施方案中, 因子 XI 多肽是在例如, Sun, Y. & Gailani, D.(1996), J. Biol. Chem. 271: 29023-29028 中公开的野生型人因子 XI。

它还包括从一个个体到另一个体中存在和出现的因子 XI 的天然等位基因变异体。另外, 糖基化的程度和位置或其它翻译后修饰可根据选定的宿主
25 细胞和宿主细胞环境的特性而变化。术语“因子 XI”也试图包括其未裂解(酶原)形式的因子 XI 多肽, 和已经被蛋白水解加工以产生其各自的生物活性形式, 且可命名为因子 XIa 的那些多肽。

“因子 XI-相关性多肽”包括, 但不限于, 相对于人因子 XI 被化学修饰和/或相对于人因子 XI 含有一个或多个氨基酸序列改变(即, 因子 XI 变异体),
30 和/或相对于人因子 XI 含有截短的氨基酸序列(即, 因子 XI 片断)的因子 XI 多肽。该因子 XI 相关性多肽可相对于人因子 XI 表现出不同特性, 包括稳定

性，磷脂结合，比活改变，等。

术语“因子 XI 相关性多肽”试图包括以其未裂解(酶原)形式的该多肽，和已经被蛋白水解加工以产生其各自的生物活性形式，且可命名为“因子 XIa 相关性多肽”或“活化的因子 XI 相关性多肽”的那些多肽。

5 本文使用的“因子 XI 相关性多肽”包括，但不限于，相对于野生型人因子 XI 表现出基本上相同或提高的生物学活性的多肽，以及因子 XI 的生物学活性相对于野生型人因子 XI 的活性基本上被修饰或降低的多肽。这些多肽包括，但不限于，被化学修饰的因子 XI 或因子 XIa 和导入了可修饰或破坏该多肽生物活性的特定氨基酸序列改变的因子 XI 变异体。

10 它还包括具有略有修饰的氨基酸序列的多肽，例如，具有包括 N-末端氨基酸缺失或添加的修饰的 N-末端的多肽，和/或相对于人因子 XI 被化学修饰的多肽。

不论比野生型因子 XI 表现出基本上相同或更好的生物活性，还是选择相对于野生型因子 XI 表现出基本上修饰或降低的生物学活性，包括因子 XI
15 的变异体的因子 XI 相关性多肽包括，但不限于，具有通过一个或多个氨基酸的插入，缺失，或取代而不同于野生型因子 XI 序列的氨基酸序列的多肽。

包括变异体的因子 XI 相关性多肽包括在本说明书所述的因子 XI 活性试验中检测时表现出至少大约 10%，至少大约 20%，至少大约 30%，至少大约 40%，至少大约 50%，至少大约 60%，至少大约 70%，至少大约 80%，
20 至少大约 90%，至少大约 100%，至少大约 110%，至少大约 120%，且至少大约 130% 的在相同细胞类型中产生的野生型因子 XI 的比活的那些多肽。

相对于野生型因子 XI 具有基本上相同或改进的生物学活性的包括变异体的因子 XI 相关性多肽包括在所述一个或多个特异性因子 XI 活性试验中检测时表现出至少大约 25%，优选至少大约 50%，更优选至少大约 75%，更
25 优选至少大约 100%，更优选至少大约 110%，更优选至少大约 120%，且最优选至少大约 130% 的在相同细胞类型中产生的野生型人因子 XI 的特异性生物学活性的那些多肽。为了本发明的目的，因子 XI 的生物学活性可按本说明书中随后所述定量(“试验部分”)。

相对于野生型因子 XI 具有基本上降低的生物学活性的包括变异体的因子
30 XI 相关性多肽是在上述一个或多个特异性因子 XI 活性试验中检测时表现出不低于约 25%，优选不低于约 10%，更优选不低于约 5% 且最优选不低于

约 1% 的在相同细胞类型中产生的野生型因子 XI 的比活的那些多肽。

因子 XI 多肽的非限制性例子包括在例如, Gailani & Broze (1993), *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4: 15-20, 或 Kerbiriou & Griffin (1979), *J. Biol. Chem.*, 254: 12020-12207 中所述的血浆来源的人因子 XI。

- 5 在一些实施方案中, 因子 XI 是因子 XI 相关性多肽, 其中在“FXI 产色试验”(参见下文)中检测时所述的因子 XI 多肽的活性和天然人因子 XI(野生型因子 XI)的活性之间的比率是至少大约 1.25; 在其它实施方案中, 该比率为至少大约 2.0; 在其它实施方案中, 该比率是至少大约 4.0。

- 10 因子 XI 相关性多肽也包括保留其特征性止血相关活性的因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的片断。例如, 使用在本说明书中所述的因子 XI 活性试验可测量因子 XI 多肽的止血相关活性。

在优选的实施方案中, 因子 XI 是人血浆因子 XI 或活化的人血浆因子 XIa。在一个实施方案中, FXI 是血小板因子 XI。在另一实施方案中, FXI 是重组制备的。

15

定义

- 在本文中, 氨基酸的三字母或单字母代码按表 1 所示的其常规含义使用。除非清楚表明, 本文提及的氨基酸是 L-氨基酸。应明白, 在例如, K337 中的第一个字母代表野生型因子 VII 在所述位置天然存在的氨基酸, 且例如, 20 [K337A]-FVIIa 表示 FVII-变体, 其中在所示位置天然存在的由单字母代码 K 表示的氨基酸被单字母代码 A 表示的氨基酸取代。

表 1: 氨基酸的缩写:

氨基酸	三字母代码	单字母代码
甘氨酸	Gly	G
脯氨酸	Pro	P
丙氨酸	Ala	A
缬氨酸	Val	V
亮氨酸	Leu	L
异亮氨酸	Ile	I
甲硫氨酸	Met	M
半胱氨酸	Cys	C
苯丙氨酸	Phe	F
酪氨酸	Tyr	Y
色氨酸	Trp	W
组氨酸	His	H
赖氨酸	Lys	K
精氨酸	Arg	R
谷氨酰胺	Gln	Q
天冬酰胺	Asn	N
谷氨酸	Glu	E
天冬氨酸	Asp	D

术语“因子 VIIa”或“VIIa”可互换使用。术语因子 VIIa 包括酶原因子 VII(单链因子 VII)。术语“因子 XI”或“FXI”可互换使用。该术语“因子 VIII”或“FVIII”可互换使用。术语“因子 VIII”或“FVIII”包括活化的因子 VIII(FVIIIa), 保留了特征性 FVIII-相关的止血活性的变异体和截短形式; 该术语包括重组制备的 FVIII 和血浆来源的 FVIII。优选人 FVIII 和人重组 FVIII。

10 在本文中, “凝血酶产生受损的受试者”是指在活化的血小板表面不能产生充分的凝血酶爆发的受试者, 且包括比具有完全功能的正常止血系统, 包括正常量和功能的凝血因子, 血小板和血纤蛋白原(例如, 在收集的正常人

血浆中)的受试者产生的凝血酶更少的受试者,且包括,但不限于,缺乏因子 VIII 的受试者;血小板数目降低或血小板具有功能缺陷的受试者(例如,血小板减少症或格兰茨曼血小板功能不全或出血过多的受试者);凝血酶原, FX 或 FVII 水平降低的受试者;一些凝血因子水平降低的受试者(例如,由于外伤或大范围手术出血过多);和血纤蛋白原的血浆浓度降低的受试者(例如,多次输血的受试者)。

“凝血酶产生水平”或“正常凝血酶产生”是指与健康受试者的水平相比患者的凝血酶产生的水平。该水平称为正常水平百分数。如果合适,该术语可互换使用。

10 术语“止血系统的增强”是指产生凝血酶的能力增强。术语“增强止血”试图包含,在相同的凝血酶产生试验中检测时,含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的试验样品所测量的凝血酶产生,相对于分别仅含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的对照样品的单个凝血酶产生而言,延长的情况。凝血酶产生可按在本说明书的凝血酶产生试验中所述测定(参见“试验部分”)。

15 本文使用的“唯一”试剂或因子是指,因子 VII 或因子 VII-相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽一起是药用组合物或试剂盒中包含的唯一止血剂,或活性止血剂,或凝血因子,或者是在特定疗程中,例如在特定出血发作过程中给患者施用的唯一止血剂,或活性止血剂,或凝血因子。应明白这些情况包括,其它可以应用的止血剂或凝血因子的量或活性不足以明显影响一种或多种凝血参数的那些情况。

凝血溶解时间,凝血强度,血纤蛋白凝血形成,和凝血时间是用于测定患者止血系统状态的临床参数。血液样品以合适的时间间隔从患者抽取且通过诸如凝血弹性描记法等方法测定一种或多种参数,例如按 Meh 等, Blood Coagulation & Fibrinolysis 2001; 12: 627-637; Vig 等, Hematology, Vol.6(3), 25 第 205-213 页(2001); Vig 等, Blood coagulation & fibrinolysis, Vol.12(7), 第 555-561 页(2001) Oct; Glidden 等, Clinical and applied thrombosis/hemostasis, Vol. 6(4), 第 226-233 页(2000)Oct; McKenzie 等, Cardiology, Vol. 92 (4), 第 240-247 页(1999)Apr; 或 Davis 等, Journal of the American Society of Nephrology, Vol. 6 (4), 第 1250-1255 页(1995)所述。

30 术语“延长凝血溶解时间”试图包含,在相同的凝血溶解试验中检测时,

对于含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的试验样品测量的凝血溶解时间相对于分别仅含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的对照样品的单个凝血溶解时间延长的情况。凝血溶解时间可按上述测定。

- 5 术语“增强凝血强度”试图包含在相同的凝血强度试验中检测时，对于含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的试验样品测量的凝血强度，例如机械强度相对于分别仅含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的对照样品的单个凝血强度增强的情况。凝血强度可按例如，Carr 等，1991.(Carr ME, Zekert SL, 10 血浆凝血形成期间血小板介导的强度形成，AM J MED SCI 1991; 302: 13-8) 所述，或者按上述通过凝血弹性描记法测定。

- 术语“增强血纤蛋白凝血形成”试图包含在相同的凝血试验中检测时，对于含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的试验样品测量的血纤蛋白凝血形成的速率或程度相对于分别仅含有 15 因子 VII 或因子 VII-相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的对照样品的单个血纤蛋白凝血形成的速率或程度提高的情况。血纤蛋白凝血形成可按上述测定。

- 术语“缩短凝血时间”试图包含在相同的凝血试验中检测时，对于含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的试 20 验样品测量的凝血形成时间(凝血时间)相对于分别仅含有因子 VII 或因子 VII-相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的对照样品的单个凝血时间缩短(注：原文为“增加”，可能有误)的情况。凝血时间可借助于普通技术人员已知的标准 PT 或 aPTT 试验来测定。

- 术语“血小板计数或活性降低”是指受试者血浆中存在的血小板(凝血细 25 胞)的数目和该血小板的生物学的，凝血相关的活性。计数降低可能是由于例如，血小板破坏增加，血小板生产降低，和比脾脏中血小板正常部分更大的聚集。例如，血小板减少症限定为每微升不低于 150,000 个血小板的血小板计数；正常血小板计数的上限一般认为在每微升 350,000 至 450,000 个血小板之间。血小板计数可通过自动血小板计数器测量；它是本领域的技术人员 30 熟知的方法。血小板计数降低引起的综合征包括，但不限于血小板减少症，凝血病。“活性”包括，但不限于，血小板的聚集，粘附，和凝血活性。活性

下降可能是由于，例如，糖蛋白异常，细胞膜-细胞骨架相互作用异常，血小板颗粒异常，血小板凝血活性异常，信号转导和分泌异常。血小板活性，包括聚集，粘附和凝血活性，通过技术人员已知的标准方法测量，例如，参见 Platelets. A Practical Approach, Ed. S. P. Watson & K. S. Authi: Clinical Aspects of Platelet Disorders (K. J. Clemetson) 15: 299-318,1996, Oxford University Press; Williams Hematology, Sixth Edition, Eds. Butler, Lichtman, Coller, Kipps & Seligsohn, 2001, McGraw-Hill。血小板活性降低引起的综合征包括，但不限于，格兰茨曼血小板功能不全，伯-苏综合征，抗凝剂治疗和溶解血栓治疗。“降低”是指在相同试验中测量时与正常收集的血浆样品中的计数或活性相比的试验血浆样品的计数或活性。

本文使用的术语“出血紊乱”是指在出血发作中出现的细胞或分子来源的，先天性，获得性或诱导性的任何缺陷。出血紊乱的例子包括，但不限于，凝血因子缺乏(例如，凝血因子 VIII, IX, XI 或 VII 缺乏)，凝血因子抑制剂，缺陷型血小板功能(例如，格兰茨曼血小板功能不全和伯-苏综合征)，血小板减少症，冯·维勒布兰德病，和诸如由凝血蛋白稀释，纤维蛋白溶解增加和由于出血和/或输血的血小板数目降低(例如，在经历手术或外伤的多次输血的受试者中)引起的凝血病。

出血是指血液从循环系统的任何成份中溢出。术语“出血发作”是指包括与手术，外伤，或其它形式的组织损伤相联系的，不需要的，不受控制的且通常是过多的出血，以及在具有出血紊乱的受试者中不需要的出血。出血发作可在具有基本上正常的凝血系统但经历了(暂时)凝血病的受试者中，以及在具有先天性或获得性凝血或出血紊乱的受试者中发生。在具有缺陷型血小板功能的受试者中，出血类似于由血友病引起的出血，因为与血友病中一样，止血系统缺乏或具有异常的必需凝血“化合物”(例如，血小板或冯·维勒布兰德因子蛋白)。在经历诸如与手术或严重外伤相联系的广泛组织损伤的受试者中，即时止血的要求可能超出正常的止血机制且不管基本上(外伤前或手术前)正常的止血机制存在与否他们都可形成过多出血。该受试者通常还接受多次输血，由于出血和/或输血形成(暂时)凝血病(即，由于出血和/或输血稀释凝血蛋白，纤维蛋白溶解增加和血小板数目降低)。出血也可能出现在诸如脑，内耳区和眼的器官中，它们是手术止血可能性有限的区域且因此实现满意的止血成问题。在从各种器官(肝脏，肺，肿瘤组织，胃肠道)取活检

组织的过程中以及在腹腔镜检手术和游离耻骨后前列腺切除术中会出现相同的问题。所有这些情况的共同点是难以通过手术技术(缝合,止血钳,等)进行止血,当出血扩散(例如,出血性胃炎和过多的子宫出血)时情况也是如此。出血也可能出现在抗凝剂治疗的受试者中;其中由提供的治疗诱导了止血缺陷;这些出血通常是急性和过多的。抗凝剂疗法通常用于防止血栓栓塞疾病。该疗法可包括肝素,其它形式的蛋白聚糖,华法令或其它形式的维生素 K 拮抗剂以及阿斯匹林和其它血小板聚集抑制剂,例如,抗体或 GP IIb/IIIa 活性的其它抑制剂。出血也可以是由于包含与抗血小板剂(例如乙酰水杨酸),抗凝剂(例如,肝素),和纤维蛋白溶解剂(例如,组织纤溶酶原激活剂, tPA)联合治疗的所谓溶解血栓疗法引起。出血发作也意味着包括,但不限于在具有急性出血性关节炎(关节出血),慢性血友病关节炎,血肿,(例如肌肉,腹膜后,舌下和咽后)的受试者中与手术或外伤相联系的不受控制的和过多的出血,在其它组织中的出血,血尿(肾道出血),脑出血,手术(例如,肝切除术),拔牙,和胃肠出血(例如,UGI 出血)。出血发作可与抗因子 VIII 的抑制剂;血友病 A;具有抑制剂的血友病 A;血友病 B;因子 VII 缺乏;因子 XI 缺乏;血小板减少症;冯.维勒布兰德因子缺乏(冯.维勒布兰德疾病);严重组织损伤;严重外伤;手术;腹腔镜检手术;出血性胃炎;进行活组织检查;抗凝剂疗法;上部胃肠道出血(UGI);或干细胞移植相联系。出血发作可以是过多的子宫出血;在机械止血可能性有限的器官中发生;在脑部发生;在内耳区发生;或在眼中发生。术语“出血发作”和“出血”如果合适可互换使用。

在本文中,术语“治疗”意味着包括为了抑制或最小化出血而阻止预期的出血(如手术中的出血),和调节已经发生的出血(如外伤中的出血)。上文提及的“预期的出血”可以是预期在特定组织或器官中发生的出血,或者可以是非特定的出血。因此在术语“治疗”中包括预防性施用因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品。

本文使用的术语“受试者”是指任何动物,特别是哺乳动物,例如人,且如果合适,可与术语“患者”互换使用。

本说明书中限定的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽可同时或顺序给药。该因子可按单个剂型提供,其中单个剂型含有两种凝血因子,或者以含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品作为第一单位剂型和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品作为第二单位的剂型的组

装试剂盒形式提供。在本说明书中无论何时提及第一或第二或第三，等，的单位剂量，它并不表示优选的给药顺序，而仅仅是为了描述方便。

“同时”施用因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的制品是指以单个剂型施用凝血因子蛋白质，或者先施用第一凝血因子蛋白质，接着在不超过 15 分钟，优选 10，更优选 5，更优选 2 分钟的时间间隔内施用第二凝血因子蛋白质。可首先施用任一因子。

“顺序”给药是指先施用第一凝血因子蛋白质，接着在多达 2 小时，优选 1 至 2 小时，更优选多达 1 小时，更优选 30 分钟至 1 小时，更优选多达 30 分钟，更优选 15 至 30 分钟的时间间隔内施用第二凝血因子蛋白质。可首先施用两种单位剂型或者凝血因子蛋白质中的任一种。优选的是，通过同一次静脉内途径注射两种产品。

“因子 XI 的水平”或“因子 XI 水平”是指与健康受试者水平相比的患者凝血因子 XI 活性水平。该水平称为正常水平的百分数。该术语如果合适可互换使用。

“因子 XI 的水平降低”或“降低的因子 XI 水平”是指与没有凝血因子 XI 缺陷或针对凝血因子 XI 的抑制剂的受试者群体中的平均因子 XI 水平相比血流中存在的因子 XI 或其活性的减少。循环因子 XI 的水平可通过凝血或免疫学试验中的任一种来测量。因子 XI 的促凝血活性通过患者血浆矫正因子 XI 缺陷型血浆的凝血时间的能力来测定(例如，APTT 试验，见下文；也参见本说明书“试验部分”)。

一个单位的因子 XI 定义为在 1 毫升正常(收集的)人血浆中存在的因子 XI 的量(相应于 100% 的因子 XI 水平)。

一个单位的因子 VII 定义为在 1 ml 正常血浆中存在的因子 VII 的量，相应于大约 0.5 μ g 蛋白质。活化后，50 个单位相应于大约 1 μ g 蛋白质。

“缺乏”是指与正常健康个体相比血浆中的例如，因子 XI 的存在或活性减少。该术语如果合适可与“因子 XI 水平降低”互换使用。

“APTT”或“aPTT”是指活化的部分组织促凝血酶原激酶时间(例如，Proctor RR, Rapaport SI：用高岭土的部分组织促凝血酶原激酶时间；第一阶段血浆凝血因子缺陷的简单筛选试验。Am J Clin Pathol 36: 212, 1961 所述)。

“因子 XI 反应综合征”是指给需要的受试者施用的外源性因子 XI 可预防，治愈或改善预期或存在的，由该综合征引起的任何症状，状况或疾病的

综合征。包括，但不限于，由因子 XI 水平降低引起的综合征，例如，由因子 XI 的抑制剂引起的出血紊乱。因子 XI 反应综合征也可用根据本发明的组合物治疗。

“因子 VII 反应综合征”是指给需要的受试者施用的外源性因子 VII，优选因子 VIIa 可预防，治愈或改善预期或存在的，由该综合征引起的任何症状，状况或疾病的综合征。包括，但不限于，由凝血因子 VIII，IX，XI 或 VII 水平降低，凝血因子抑制剂，缺陷型血小板功能引起的综合征(例如，格兰茨曼血小板功能不全和伯-苏综合征)，血小板减少症，冯·维勒布兰德病，和诸如由凝血蛋白稀释，纤维蛋白溶解增加和由于出血和/或输血的血小板数目降低(例如，在经历手术或外伤的多次输血的受试者中)引起的凝血病。

“半寿期”是指因子 VII 或因子 VII 相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的血浆浓度从特定值减少到该值的一半所需的时间。

“初级止血”是指由 FXa 和 TF:因子 VIIa 初步产生凝血酶，接着激活血小板且活化的，附着的血小板形成初步的松散血栓，其还未被血纤蛋白稳固，最终被交联的血纤蛋白稳固。如果不被在止血过程的第二步期间形成的血纤蛋白稳固(维持止血)，该血栓容易被纤维蛋白溶解系统溶解。

“次级止血”或“维持止血”是指在活化的血小板表面发生的且由因子 VIIa 和因子 VIIIa 催化的凝血酶的次级，完全，和主要的爆发或产生，随后形成血纤蛋白和稳固初步血小板血栓。血纤蛋白稳固血栓导致完全止血。

“完全止血”是指在损伤位点形成有效止血且不容易被纤维蛋白溶解系统溶解的稳定且坚硬的血纤蛋白凝血或血栓。在本说明书中，术语止血可用于表示上述完全止血。

制品中蛋白质的总量可用公知的方法，例如，通过测量光密度来测量。凝血因子 XI 或因子 VII 蛋白质(“抗原”)的量可通过诸如标准 ELISA 免疫测定法的公知方法来测量。一般来说，该测定法通过使例如含有因子 XI 蛋白质制品的溶液与固定到 ELISA 板上的抗 FXI 抗体接触，随后使固定的抗体-因子 XI 复合物与携带标记的第二抗 FXI 抗体接触，在第三步中测量该标记的量来进行。各凝血因子的量可使用合适的抗体以相似的方式测量。制品中存在的凝血因子蛋白质的总量可通过加入各凝血因子蛋白质的量来测定。在一个实施方案中，该制品包含分离的凝血因子。在另一实施方案中，该制品不含凝血因子 II 和凝血因子 IIa (凝血酶原和凝血酶)和/或因子 X 或 Xa。

本文所用的术语“分离的”是指从合成它们的细胞中或者天然发现它们的介质(例如, 血浆或血液)中分离的诸如因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的凝血因子。通过本领域已知的任何方法, 包括, 但不限于, 从贴壁细胞培养物中取出含有所需产物的细胞培养基; 离心或过滤以去掉非贴壁细胞; 等来完成从其来源细胞分离多肽。通过本领域已知的任何方法, 包括, 但不限于, 诸如分别在抗因子 VII 或抗因子 XI 抗体柱上的亲和色谱法; 疏水相互作用色谱法; 离子交换色谱法; 大小排阻色谱法; 电泳方法(例如, 制备型等电聚焦(IEF)), 差示溶解(例如, 硫酸铵沉淀), 或萃取等可完成从其天然存在的介质中分离多肽。

10 术语“TFPI 抑制剂”是指抑制 TFPI(组织因子途径抑制剂)的抗凝血活性的化合物。该术语包括诸如在欧洲专利号 558,529, WO 96/28153 和 US 5,622,988 中公开的那些化合物。“TFPI”和“EPI”(外源性途径抑制剂)可交换使用。

15 本发明中因子 VII 多肽和因子 XI 多肽的“有效量”定义为因子 VII 多肽, 例如 FVIIa, 和因子 XI 多肽一起足以防止或减少出血或失血, 足以治愈, 减轻或部分控制该疾病及其并发症的量。

术语“因子 VIIa 的活性”或“因子 VIIa 活性”包括产生凝血酶的能力; 该术语也包括在不存在组织因子时在活化的血小板表面产生凝血酶的能力。

20 根据本发明的组合物还包括 TFPI-抑制剂。根据本发明的组合物还包括因子 VIII。该组合物优选给没有针对因子 VIII 的抑制剂的受试者给药。

缩写

	TF	组织因子
	FVII	以其单链, 未活化形式的因子 VII
25	FVIIa	以其活化形式的因子 VII
	rFVIIa	以其活化形式的重组因子 VII
	FXI	以其酶原的, 未活化形式的因子 XI
	FXIa	以其活化形式的因子 XI
	rFXI	重组 FXI
30	rFXIa	重组 FXIa
	FVIII	以其酶原的, 未活化形式的因子 VIII

rFVIII	重组 FVIII
FVIIIa	以其活化形式的因子 VIII
rFVIIIa	重组 FVIIIa
TFPI	组织因子途径抑制剂

5

化合物的制备:

适用于本发明的人纯化因子 VIIa 优选以 DNA 重组技术, 例如按 Hagen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2412-2416, 1986 所述, 或者按欧洲专利号 200,421 (ZymoGenetics, Inc.) 所述制备。

- 10 因子 VII 也可按 Broze and Majerus, J. Biol. Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 和 Hedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841, 1983 所述的方法产生。这些方法产生因子 VII, 不含可检测量的其它凝血因子。通过包括额外的凝胶过滤作为最终纯化步骤可获得甚至更纯化的因子 VII 制品。然后通过已知方法, 例如通过一些不同的血浆蛋白质, 例如因子 XIIa, IX 或 Xa 可将
- 15 因子 VII 转变成活化因子 FVIIa。另外, 按 Bjoern 等(Research Disclosure, 269, 1986 年 9 月, 第 564-565 页)所述, 将其通过诸如 Mono Q®(Pharmacia fine Chemicals) 等的离子交换色谱柱可活化因子 VII。

- 因子 VII 相关性多肽可通过修饰野生型因子 VII 或者通过重组技术产生。与野生型因子 VII 相比具有改变的氨基酸序列的因子 VII 相关性多肽可通过
- 20 已知方法, 例如通过定点诱变改变编码天然因子 VII 的核酸中的氨基酸密码子或者去掉一些氨基酸密码子来修饰编码野生型因子 VII 的核酸序列来生产。

- 可在因子 VIIa 或因子 XI 分子的功能关键性区域之外进行取代且仍然产生活性多肽对本领域的技术人员而言是显而易见的。按照本领域已知的方法,
- 25 例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变可鉴定对因子 VII 或因子 VII 相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的活性必需的, 且因此优选不进行取代的氨基酸残基(参见, 例如, Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085)。在最后一技术中, 在该分子的每一个带正电荷的残基处导入突变, 并检测所得的突变体分子的凝血, 各自的交联活性以鉴定对该分子的活性关键的氨基酸残基。底物-酶相互作用位点也可通过分析以诸如核磁共振分析,
- 30 结晶学或光亲和标记的技术测定的三维结构来测定(参见, 例如, de Vos 等,

1992, *Science* 255 : 306-312; Smith 等, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224 : 899-904; Wlodaver 等, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64)。

5 使用本领域已知的任一方法通过定点诱变可完成将突变导入核酸序列使得用一个核苷酸替换另一核苷酸。特别有用的是利用含有目的插入片断的超螺旋双链 DNA 载体和含有所需突变的两个合成引物的方法。分别与该载体的相反链互补的寡核苷酸引物借助于 Pfu DNA 聚合酶在温度循环期间延伸。该引物掺入时, 产生含有交错缺口的突变质粒。温度循环后, 用对甲基化和半甲基化 DNA 特异性的 DpnI 处理该产物以便消化亲本 DNA 模板并选择含有突变的合成 DNA。也可使用本领域已知的产生, 鉴定和分离变异体的其它方法, 例如, 基因改组或噬菌体展示技术。

10 通过本领域已知的任一方法, 包括, 但不限于, 从贴壁细胞培养物取出含有所需产物的细胞培养基; 离心或过滤以去掉非贴壁细胞; 等可完成从其细胞来源分离多肽。

15 任选的是, 可进一步纯化因子 VII 或因子 VII 相关性多肽。使用本领域已知的任何方法, 包括, 但不限于, 诸如在抗因子 VII 抗体柱上的亲和色谱法(参见, 例如, Wakabayashi 等, *J. Biol. Chem.* 261: 11097, 1986; 和 Thim 等, *Biochem.* 27: 7785, 1988); 疏水相互作用色谱法; 离子交换色谱法; 大小排阻色谱法; 电泳方法(例如, 制备型等电聚焦(IEF)), 差示溶解(例如, 硫酸铵沉淀), 或萃取等可完成纯化。一般来说, 参见 Scopes, *Protein Purification*, 20 Springer-Verlag, New York, 1982; 和 *Protein Purification*, J. C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989。纯化后, 该制品优选含有约 10% 重量以下, 更优选约 5% 以下, 最优选约 1% 以下的来自宿主细胞的非因子 VII 或因子 VII 相关性多肽。

25 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽可使用因子 XIIa 或具有胰蛋白酶样特异性的其它蛋白酶, 例如, 因子 IXa, 激肽释放酶, 因子 Xa, 和凝血酶通过蛋白水解裂解活化。参见, 例如, Osterud 等, *Biochem.* 11: 2853 (1972); Thomas, 美国专利号 4,456,591; 和 Hedner 等, *J. Clin. Invest.* 71: 1836 (1983)。另外, 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽可将其通过诸如 Mono Q®(Pharmacia)等的离子交换色谱柱活化。然后所得的活化因子 VII 或因子 VII 相关性多肽可按下文所述配制和给药。

30 本发明中使用的因子 XI 可按照已知方法, 例如本文作为参考文献引用

的 Koide 等(Biochemistry 16: 2279-2286, 1977)和 Bouma 等(J. Biol. Chem. 252: 6432-6437,1977)公开的那些方法从血浆中制备。然而, 优选使用重组因子 XI 以避免使用带有疾病传播危险的血液或组织来源的产品。制备重组因子 XI 的方法是本领域已知的。参见, 例如, Kemball-Cook 等(Gene 139(2): 5 275-279, 1994), Fujikawa 等(Biochemistry 25: 2417-2424, 1986), Meijers 等(Blood 79 (6): 1435-1440, 1992), 本文引用以其整体作为参考。

因子 XI 相关性多肽可通过修饰野生型因子 XI 或者通过重组技术产生。与野生型因子 XI 相比具有改变的氨基酸序列的因子 XI 相关性多肽可按上文更详细的描述通过已知方法, 例如通过定点诱变改变编码天然因子 XI 的核
10 酸中的氨基酸密码子或者去掉一些氨基酸密码子, 修饰编码野生型因子 XI 的核酸序列来生产。通过本领域已知的任一方法, 包括, 但不限于, 从贴壁细胞培养物取出含有所需产物的细胞培养基; 离心或过滤以去掉非贴壁细胞; 等可完成从其细胞来源分离多肽。任选的是, 可进一步纯化因子 XI 或因子 XI 相关性多肽。可按上文更详细的描述使用本领域已知的任何方法,
15 包括, 但不限于, 诸如在抗因子 XI 抗体柱上的亲和色谱法; 疏水相互作用色谱法; 离子交换色谱法; 大小排阻色谱法; 电泳方法(例如, 制备型等电聚焦(IEF)), 差示溶解(例如, 硫酸铵沉淀), 或萃取等完成纯化。纯化后, 该制品优选含有约 10% 重量以下, 更优选约 5% 以下, 最优选约 1% 以下的来自宿主细胞的非因子 XI 或因子 XI 相关性多肽。然后所得的活化因子 XI 或
20 因子 XI 相关性多肽可按下文所述配制和给药。

本领域的技术人员将预料到, 优选使用与受试者同源的因子 XI 和因子 VIIa 蛋白质以降低诱导免疫反应的风险。非人因子 XI 的制备和鉴定已被例如, Gailani(Blood 90(3):1055-1064,1997)公开。本发明还包括该因子 XI 和因子 VIIa 蛋白质在兽医方法中的用途。

25

药用组合物和使用方法

本发明的制品可用于治疗任何因子 VII 反应综合征, 例如出血紊乱, 包括, 但不限于由凝血因子 VIII, IX, XI 或 VII 水平降低, 凝血因子抑制剂, 缺陷型血小板功能引起的综合征(例如, 格兰茨曼血小板功能不全和伯-苏综合征), 血小板减少症, 冯·维勒布兰德病, 和诸如由凝血蛋白稀释, 纤维蛋
30 白溶解增加和由于出血和/或输血的血小板数目降低(例如, 在经历手术或外

伤的多次输血的受试者中)引起的凝血病。根据本发明的含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的药用组合物主要用于肠胃外给药用于预防性和/或治疗性治疗。优选的是, 该药用组合物通过肠胃外给药, 即静脉内, 皮下, 或肌肉内; 最优选静脉内给药。它们也可通过连续或脉动输注给药。

根据本发明的药用组合物或配制品包含以单个单位剂型或者以组装试剂盒的形式配制的, 优选溶于药用上可接受的载体, 优选含水载体或稀释剂中的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽, 和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽。简单地说, 适合于根据本发明的用途的药用组合物可通过将因子 VIIa, 或因子 XI, 或者因子 VIIa 与因子 XI 的组合(优选纯化形式), 与合适的佐剂和合适的载体或稀释剂混合来制备。可使用各种含水载体, 例如水, 缓冲水, 0.4% 盐水, 0.3% 甘氨酸等。本发明的制品也可使用非水载体配制, 例如, 以凝胶的形式或者作为脂质体制品用于给药或者定向到损伤位点。脂质体制品一般按例如, 美国专利号 4,837,028, 4,501,728, 和 4,975,282 中所述。该组合物可按常规的, 熟知的灭菌技术灭菌。包装所得的水溶液备用或者在无菌条件下过滤并冻干, 该冻干制品在给药前与无菌水溶液混合。

该组合物可含有药用上可接受的辅助物质或佐剂, 包括, 但不限于, pH 调节和缓冲剂和/或张力调节剂, 例如, 乙酸钠, 乳酸钠, 氯化钠, 氯化钾, 氯化钙, 等。

配制品还可包括一种或多种稀释剂, 乳化剂, 防腐剂, 缓冲剂, 赋形剂等且可作为诸如液体, 粉末, 乳剂, 缓释剂等的形式提供。本领域的技术人员以合适的方式且根据诸如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 中公开的公认的实践可配制本发明的组合物。因此, 用于静脉内输注的典型药用组合物可配制成含有 250 ml 的无菌林格溶液和 10 mg 该制品。

可施用含有本发明制品的组合物用于预防性和/或治疗性治疗。在治疗应用中, 给已经患有上述疾病的受试者施用对于治愈, 减轻或部分阻止该疾病及其并发症的临床表现足够量的组合物。实现这点的足够量定义为“治疗有效量”。各目的的有效量依赖于该疾病或损伤的严重性以及受试者的体重和一般状态。应明白测定合适的剂量可使用常规实验通过建立数值矩阵并试验该矩阵中的不同点来完成。

本发明制品的局部给药，例如，局部应用可通过例如，借助于喷雾，灌注，双气囊导管，支架(stent)，插入血管移植物或支架，用于覆盖气囊导管的水凝胶，或者其它充分确定的方法进行。在任一情况下，该药用组合物应提供足以有效治疗该状况的制品量。

- 5 在这些配制品中因子 VII 或因子 VII 相关性多肽，因子 XI 或因子 XI 相关性多肽，或者因子 VII 或因子 VII 相关性多肽与因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的组的浓度可在大范围内变化，即从不足约 0.5% 的重量，通常为或者至少为大约 1% 的重量至高达 15 或 20% 的重量且根据选定的具体给药方式主要通过液体体积，粘度等进行选择。优选通过注射或输注，特别是注射
- 10 给药。因此，因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽以适合于静脉内给药的形式制备，例如该制品可以是在一种剂型中同时含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的溶解冻干粉末或液体配制品，或者是在一种剂型中含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的溶解冻干粉末或液体配制品和在另一剂型中含有因子 XI 或因子 XI
- 15 相关性多肽的溶解冻干粉末或液体配制品。

应明白因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的量和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的量一起包含治疗出血发作的合计有效量。

- 必须记住本发明的物质一般可用于严重疾病或损伤状态，即威胁生命或可能威胁生命的情况。在该情况下，鉴于外源性物质最小化且人体因子 VIIa
- 20 和因子 XI 的免疫原性总体缺乏，主治医师可能且认为需要施用基本上过量的该组合物。

- 在预防性应用中，含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的组合物可给疾病状态或损伤易感性或者有该危险的受试者给药以增强受试者自身的凝血能力。这一量定义为“预防有效量”。
- 25 应明白因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的量和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的量一起包含预防出血发作的合计有效量。

- 可用主治医师选定的剂量水平和方式进行该组合物的单次或多次给药。该组合物可每天或者每周给药一次或多次。该药用组合物的有效量是提供对出血发作临床上明显有效的量。该量部分取决于所治疗的具体症状，受试者的
- 30 年龄，体重，和一般健康状态，以及对本领域的技术人员显而易见的其它因素。

本发明的组合物一般在预期出血前或者在出血开始时以单个剂量给药。然而,也可根据提供的剂量和受试者的状况,优选以 2-4-6-12 小时的间隔重复给药(为多剂量)。

在与有备介入相关的治疗中,因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 5 或因子 XI 相关性多肽一般在介入前大约 24 小时内给药,且此后持续多达 7 天或更长。作为抗凝剂的给药可按本文所述的各种途径进行。

该组合物可以是以合适的浓度同时含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的制品和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的单个制品形式(单个剂型)。该组合物也可以是由含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽制品的第一单位剂型 10 和含有因子 XI 或因子 XI 相关性多肽制品的第二单位剂型组成的组装试剂盒的形式。在该情况下,因子 VII 或因子 VII 相关性多肽和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽应一个接着一个给药,优选彼此在大约 15 分钟的间隔内,例如,彼此在 10 分钟内,或者优选在 5 分钟内,或更优选彼此在 2 分钟内。可首先施用两个单位剂型中的任一种。

15 该试剂盒包括至少两个分离的药物组合物。该试剂盒包括诸如分开的瓶子或者分开的箔包装的含有该分开的组合物的容器装置。一般来说,该试剂盒包括该分开的成份的给药说明。当该分开的成份优选以不同的剂型给药,以不同的给药间隔给药时,或者当主治医师需要组合的各个成份的滴定值时,该试剂盒形式特别有利。

20 根据本发明施用的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的量和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的量可在大约 1:100 至大约 100:1 (w/w)之间的比率中变化。因此因子 VII 与因子 XI 的比率可以是,例如,大约 1:100,或 1:90,或 1:80,或 1:70 或 1:60,或 1:50,或 1:40,或 1:30,或 1:20,或 1:10,或 1:5,或 1:2,或 1:1,或 2:1,或 5:1,或 10:1,或 20:1,或 30:1,或 40:1,或 50:1,或 25 60:1,或 70:1,或 80:1,或 90:1,或 100:1; 或者在大约 1:90 至大约 1:1 之间,或者在大约 1:80 至大约 1:2 之间,或者在大约 1:70 至大约 1:5 之间,或者在大约 1:60 至大约 1:10 之间,或者在大约 1:50 至大约 1:25 之间,或者在大约 1:40 至大约 1:30 之间,或者在大约 90:1 至大约 1:1 之间,或者在大约 80:1 至大约 2:1 之间,或者在大约 70:1 至大约 5:1 之间,或者在大约 60:1 至 30 大约 10:1 之间,或者在大约 50:1 至大约 25:1 之间,或者在大约 40:1 至大约 30:1 之间。

因子 VII 或因子 VII 相关性多肽的剂量对于 70-kg 的受试者作为装载和维持剂量,可依赖于受试者的体重,状况和症状的严重性在相应于大约 0.05 mg 至大约 500 mg/天的野生型因子 VII,例如,从大约 1 mg 至大约 200 mg/天,或者,例如,从大约 5 mg 至大约 175 mg/天的剂量中变化。

- 5 因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的剂量对于 70-kg 的受试者作为装载和维持剂量,可依赖于受试者的体重,状况和症状的严重性在相应于大约 0.05 mg 至大约 500 mg/天的野生型因子 XI,例如,从大约 1 mg 至大约 200 mg/天,或者,例如,从大约 1mg 至大约 175 mg/天的剂量中变化。

- 10 因子 VIIa 和因子 XI 的组合在体外凝血硬度和纤维蛋白溶解时间试验中表现出协同效应。而且,因子 VIIa 和因子 XI 的组合在形成稳定的纤维蛋白凝血,延长半凝血溶解时间,增加凝血强度和增强对纤维蛋白溶解的抗性中表现出协同效应。

- 15 该组合物可以是以合适的浓度同时含有因子 VIIa 和因子 XI 的单个制品形式。该组合物也可以是由含有因子 VIIa 的第一单位剂型和含有因子 XI 的第二单位剂型和任选含有因子 VIII 和/或 TFPI 抑制剂的一个或多个其它单位剂型组成的试剂盒的形式。在该情况下,因子 VIIa 和因子 XI 应顺序给药,优选彼此在大约 1-2 小时的间隔内,例如,彼此在 30 分钟内,或者优选在 10 分钟内,或更优选彼此在 5 分钟内。可首先施用两个单位剂型中的任一种。

- 20 由于本发明涉及通过用可分开给药的活性成份的联合处理进行出血发作的预防或治疗或者用于凝血处理,因此,本发明还涉及以试剂盒的形式组合分开的药用组合物。该试剂盒包括至少两个分开的药用组合物。该试剂盒包括诸如分开的瓶子或者分开的箔包装的含有该分开的组合物的容器装置。一般来说,该试剂盒包括该分开的成份的给药说明。当该分开的成份优选以不同的剂型给药,以不同的给药间隔给药时,或者当主治医师需要组合的各个成份的滴定值时,该试剂盒形式特别有利。
- 25

试验:

检测因子 VIIa 的活性:

- 30 在体外试验中以简单的预试进行合适的试验以检测因子 VIIa 活性,从而选择合适的因子 VIIa 变异体:

体外水解试验

可测定天然(野生型)因子 VIIa 和因子 VIIa 变异体(两者下文均称为“因子 VIIa”)的比活。也可平行测定它们以便直接比较其比活。在微量滴定板 (MaxiSorp, Nunc, Denmark) 上进行该测定。将显色底物 D-Ile-Pro-Arg-*p*-nitroanilide(S-2288, Chromogenix, Sweden) 以终浓度 1 mM 加入溶于含有 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ 和 1 mg/ml 牛血清白蛋白的 50 mM Hepes, pH 7.4 中的因子 VIIa(终浓度为 100 nM)中。在 SpectraMax™ 340 平板阅读器(Molecular Devices, USA)上连续测量 405 nm 下的吸光度。温育 20 分钟期间形成的吸光度减去不含酶的空白孔中的吸光度后用于计算变异体和野生型因子 VIIa 活性之间的比率:

10 比率=(A_{405nm} 因子 VIIa 变异体)/(A_{405nm} 因子 VIIa 野生型)。

在此基础上, 鉴定活性相当于或者高于天然因子 VIIa 的因子 VIIa 变异体, 例如, 变异体的活性和天然因子 VII(野生型 FVII)的活性之间的比率为大约, 或者高于 1.0 的变异体。

15 因子 VIIa 或因子 VIIa 变异体的活性也可使用诸如因子 X 的生理底物, 以 100-1000 nM 的合适浓度测量, 其中在加入合适的产色底物(例如, S-2765)后测量产生的因子 Xa。另外, 可在生理温度下进行活性试验。

体外蛋白水解试验

20 平行测定天然(野生型)因子 VIIa 和因子 VIIa 变异体(两者下文均称为“因子 VIIa”)以便直接比较其比活。在微量滴定板 (MaxiSorp, Nunc, Denmark)上进行该测定。在 100 微升含有 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ 和 1 mg/ml 牛血清白蛋白的 50 mM Hepes, pH 7.4 中, 将因子 VIIa(10 nM)和因子 X(0.8 微摩尔)温育 15 分钟。然后加入 50 微升含有 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA 和 1 mg/ml 牛血清白蛋白的 50 mM Hepes, pH 7.4 终止因子 X 的裂解。通过加入终浓度为 0.5 mM 的显色底物 Z-D-Arg-Gly-Arg-*p*-nitroanilide(S-2765, Chromogenix, Sweden)测量产生的因子 Xa 的量。在 SpectraMax™ 340 平板阅读器(Molecular Devices, USA)上连续测量 405 nm 下的吸光度。10 分钟期间形成的吸光度减去不含 FVIIa 的空白孔中的吸光度后用于计算变异体和野生型因子 VIIa 的蛋白水解活性之间的比率:

30 比率=(A_{405nm} 因子 VIIa 变异体)/(A_{405nm} 因子 VIIa 野生型)。

在此基础上, 鉴定活性相当于或者高于天然因子 VIIa 的因子 VIIa 变异

体, 例如, 变异体的活性和天然因子 VII(野生型 FVII)的活性之间的比率为大约, 或者高于 1.0 的变异体。

凝血酶产生试验:

- 5 因子 VII 或因子 VII 相关性多肽或者因子 XI 或因子 XI 相关性多肽(例如, 变异体)产生凝血酶的能力可在包含生理浓度下的所有相关凝血因子和抑制剂以及活化血小板的试验中测量(按 Monroe 等(1997) Brit. J. Haematol. 99,542-547 中第 543 页所述, 本文引用以供参考)。

10 检测因子 XI 的活性:

使用例如, Gailani 等(Blood 97 (10): 3117-3122,2001) (“FXI 产色试验”)所述的产色底物在体外试验中可简单地进行合适的试验以检测因子 XI 的酰胺分解活性, 从而选择合适的因子 XI 变异体。

- 15 按例如, Gailani 等(Blood 97 (10): 3117-3122,2001)所述在测量因子 IX 活化成 IXa 的体外试验中也可简单地进行因子 XI 的生物学活性测定。

检测因子 VIII 的活性:

- 按例如, Kirkwood TBL, Rizza CR, Snape TJ, Rhymes IL, Austen DEG. 在因子 VIII 试验中鉴定实验室间差异的来源。B J Haematol 1981; 37; 559-68; 20 或 Kessels 等, British Journal of Haematology, Vol. 76 (Suppl. 1) pp. 16 (1990) 所述在体外试验中可简单地进行合适的试验以检测因子 VIII 的活性, 从而提供选择用于本发明的合适因子 VIII 变异体的方法。因子 VIII 的活性也可基于产生的 FXa 的酰胺分解活性通过两步产色试验来测量(Wagenvoord 等, 1989, Haemostasis, 19 (4): 196-204)。

- 25 按例如, Nilsson 等, 1959. (Nilsson IM, Blombaeck M, Thilen A, von Francken I, 血友病 A 携带者-实验室研究, Acta Med Scan 1959; 165: 357)中所述通过测量制品校正因子 VIII 缺陷型血浆的凝血时间的能力也可定量因子 VIII 的生物学活性。在该试验中, 生物学活性表示为单位/ml 血浆(1 个单位相应于正常收集的血浆中存在的 FVIII 的量)。

30

本发明的方面:

方面 1: 含有因子 VII 或因子 VII 相关性多肽, 和因子 XI 或因子 XI 相关性多肽的药用组合物。

实施方案 2: 方面 1 中的组合物, 其中所述的因子 VII 或因子 VII 相关性多肽是因子 VII 相关性多肽。

5 实施方案 3: 方面 1 的组合物, 其中因子 VIIa 是人因子 VIIa。

实施方案 4: 方面 1 或方面 3 中的组合物, 其中因子 VIIa 和因子 XI 是重组人因子 VIIa 和重组人因子 XI。

实施方案 5: 方面 1-4 中任一项的组合物, 其中因子 XI 是血小板因子 XI。

10 实施方案 6: 方面 1-5 中任一项的组合物, 其中因子 XI 是活化的因子 XI。

实施方案 7: 方面 1-6 中任一项的组合物, 其中该组合物还含有 TFPI 抑制剂。

15 实施方案 8: 方面 1-7 中任一项的组合物, 其中该组合物还含有因子 VIII。
方面 2: 含有治疗出血发作的试剂盒, 包括

- a) 在第一个单位剂型中的有效量的因子 VIIa 和药用上可接受的载体;
- b) 在第二个单位剂型中的有效量的因子 XI 和药用上可接受的载体; 和
- c) 含有所述第一和第二剂型的容器装置。

20 实施方案 10: 方面 2 中的组合物, 包含
a) 在第一个单位剂型中的有效量的因子 VIIa 和药用上可接受的载体;
b) 在第二个单位剂型中的有效量的因子 XI 和药用上可接受的载体;
c) 在第三个单位剂型中的有效量的 TFPI 抑制剂和药用上可接受的载体;
和

- d) 含有所述第一, 第二和第三剂型的容器装置。

25 方面 3: 含有治疗出血发作的试剂盒, 包括

a) 在第一个单位剂型中的有效量的因子 VIIa 和 TFPI 抑制剂和药用上可接受的载体;

- b) 在第二个单位剂型中的有效量的因子 XI 和药用上可接受的载体; 和
- c) 含有所述第一和第二剂型的容器装置。

30 方面 4: 含有治疗出血发作的试剂盒, 包括

- a) 在第一个单位剂型中的有效量的因子 VIIa 和药用上可接受的载体;

b)在第二个单位剂型中的有效量的因子 XI 和 TFPI 抑制剂和药用上可接受的载体；和

c)含有所述第一和第二剂型的容器装置。

5 实施方案 9: 实施方案 2-4 中任一项的试剂盒, 还含有以分开的单位剂型配制的, 或者包含在还含有选自因子 VIIa, 因子 XI 或 TFPI 抑制剂中的一种或多种化合物的一个单位剂型内的因子 VIII。

方面 6: 因子 VIIa 与因子 XI 的组合在制备治疗受试者出血发作的药物中的用途。

10 方面 7: 因子 VIIa 与因子 XI 的组合在制备用于在受试者中缩短凝血时间的药物中的用途。

方面 8: 因子 VIIa 与因子 XI 的组合在制备用于在正常哺乳动物血浆中延长凝血溶解时间的药物中的用途。

方面 9: 因子 VIIa 与因子 XI 的组合在制备用于在正常哺乳动物血浆中增加凝血强度的药物中的用途。

15 方面 10: 因子 VIIa 与因子 XI 的组合在制备用于在正常人血浆中增强血纤蛋白凝血形成的药物中的用途。

方面 11: 增强受试者血纤蛋白凝血形成的方法, 该方法包括给受试者施用有效量的因子 VIIa 与有效量的因子 XI 的组合。

20 方面 12: 治疗受试者出血发作的方法, 包括给受试者施用有效量的因子 VIIa 与有效量的因子 XI 的组合。

实施方案 10: 方面 19 或 20 的方法, 其中因子 VIIa 和因子 XI 以单个剂型给药。

实施方案 11: 方面 19 或 20 的方法, 其中因子 VIIa 和因子 XI 顺序给药。

25 通过下面的实施例可进一步说明本发明, 然而, 它们不能解释成限制保护范围。在上面描述和下面实施例中公开的特征可分开和以其任意组合作为以其不同形式实现本发明的基础。

实施例

30 实施例 1

通过将凝血因子 VIIa 和 XI 组合来提高止血型凝血的稳定性

方法:

凝血溶解试验: 将用含有 Innovin(Dade Behring, 2000-倍稀释), rFVIIa(Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark; 各种浓度)和 t-PA(American Diagnostics, 8 nM)的缓冲液(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl, pH 7.4)10倍稀释的正常人血浆加入 96 孔 ELISA 平板中并在室温下测量 650 nm 下的浊度一段时间。在指明的位置, 包含纯化的人 FXI(Haematologic Technologies, 各种浓度)。

旋转(Rotational)凝血弹性描记法(roTEG):在加入了 5 nM t-PA 的柠檬酸化正常人血浆中进行测量,分析单独或与 30 nM FXI(Haematologic Technologies)组合加入 1 nM FVIIa 的效果。加入在 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4 缓冲液中的 Innovin (2000-倍稀释的终浓度, Dade Behring # 526945)和钙(15 mM 的终浓度)开始凝血。

结果:

凝血溶解试验: 加入 FVIIa 导致凝血溶解时间的剂量依赖型延长(图 1)。该效果在 10 nM FVIIa 下最佳。在 10 nM FVIIa 存在下, 加入 FXI 导致凝血溶解时间进一步延长(图 2)。该效果为剂量依赖型且在 30 nM FXI 下最佳。

凝血弹性描记法: roTEG 测量用于分析 FVIIa 和 FXI 对最大凝血硬度(MCF), 以及凝血对 t-PA 介导型溶解的抗性的影响。加入 FVIIa/FXI 前, MCF 为 25 mm 且凝血溶解一半所需的时间为 12.3 分钟(图 3)。加入 FXI(30 nM)不改变 MCF 但将半凝血溶解时间延长到 16.1 分钟(图 3)。同样, 加入 FVIIa (1 nM)导致凝血被保护而不受 t-PA 介导的纤维蛋白溶解(半凝血溶解时间: 16.7 分钟), 对 MCF 无任何影响(图 3)。然而, FVIIa (1 nM)与 FXI (30 nM)一起加入增加 MCF (29 mm), 以及半凝血溶解时间(24.2 分钟, 图 3)。

25 结论:

这些结果证明 FVIIa 和 FXI 加入血浆中以协同的方式提高凝血的机械强度和对 t-PA 介导的纤维蛋白溶解的抗性。

实施例 2

30 通过组合凝血因子 VIIa 和 XI 缩短正常人血浆中的凝血时间

方法:

凝血试验：单独的 rFVIIa(1 μ g/ml)，单独的 FXI (25 nM)，或 rFVIIa 与 FXI 在 50 mM Pipes, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % BSA, pH 7.2 中的等分试样(55 μ l)与在相同缓冲液中含有 100 μ M PC/PS 囊泡和 50 mM CaCl₂ 的 55 μ l 等分试样温育 5 分钟。然后加入 55 μ l 正常人血浆(NHP)的等分试样，使用标准 APTT 程序在 ACL 凝血机中凝血 400 秒。

结果：

凝血试验：加入 rFVIIa 或 FXI 前，NHP 在 400 秒的监测时间内不凝血。加入 FXI (25 nM)后，凝血时间仍然长于 400 秒。加入 FVIIa(1 μ g/ml)将凝血时间缩短到 159.4 \pm 1.4 秒(图 4)。同时加入 FVIIa (1 μ g/ml)和 FXI(25 nM)将凝血时间缩短到 95.0 \pm 1.4 秒(图 4)。

结论：

这些结果证明向血浆中加入 FVIIa 和 FXI 以协同的方式缩短 NHP 中的凝血时间。

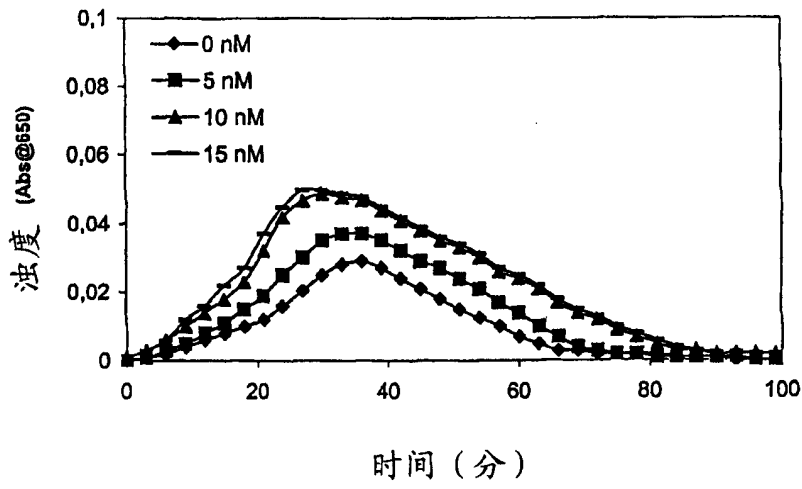


图 1

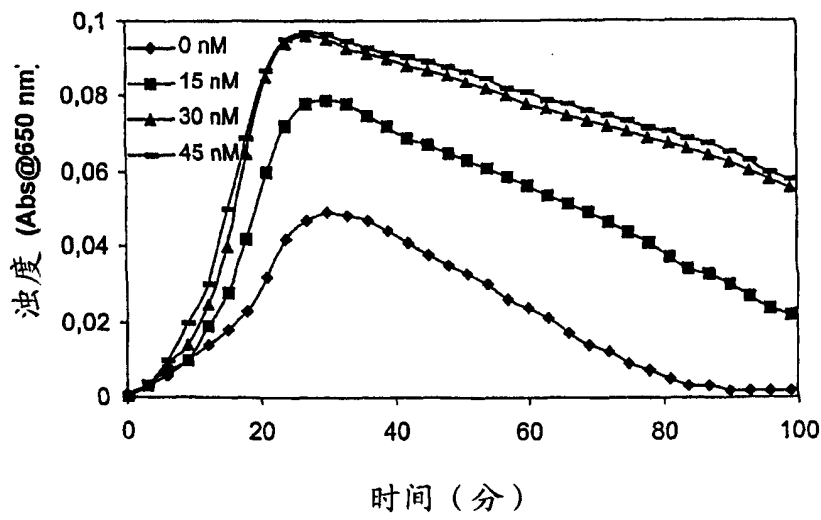


图 2

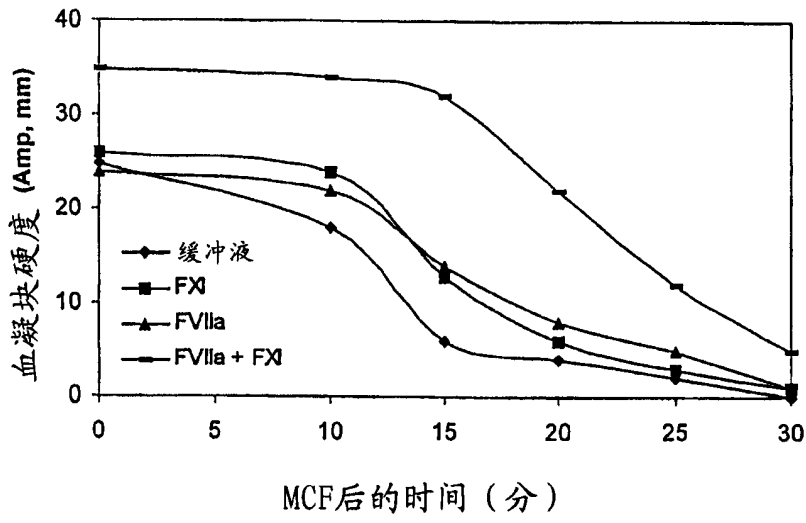


图 3

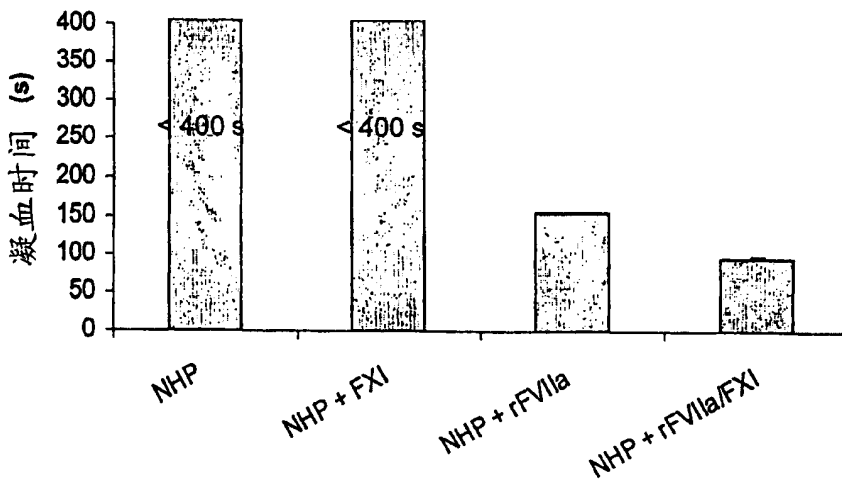


图 4