

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6198277号
(P6198277)

(45) 発行日 平成29年9月20日(2017.9.20)

(24) 登録日 平成29年9月1日(2017.9.1)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K	38/10	Z N A
G 0 1 N	33/52	(2006.01)	G 0 1 N	33/52	Z
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
G 0 1 N	21/78	(2006.01)	G 0 1 N	21/78	Z

請求項の数 6 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-527112 (P2014-527112)
(86) (22) 出願日	平成24年8月24日 (2012.8.24)
(65) 公表番号	特表2014-529606 (P2014-529606A)
(43) 公表日	平成26年11月13日 (2014.11.13)
(86) 國際出願番号	PCT/NL2012/050581
(87) 國際公開番号	W02013/028070
(87) 國際公開日	平成25年2月28日 (2013.2.28)
審査請求日	平成27年8月21日 (2015.8.21)
(31) 優先権主張番号	61/527,140
(32) 優先日	平成23年8月25日 (2011.8.25)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	506362417 ユーユムシー ユトレヒト ホールディング ビー.ブイ. オランダ国, 3584 シーエム ユトレヒト, イエールラーン 40
(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘
(74) 代理人	100165526 弁理士 阿部 寛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固促進に使用するための化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝性の出血性障害に罹患している対象又は過度の出血により特徴づけられる臨床状態を有する対象における出血の治療又はリスク低下のための医薬であって、アンチトロンビンⅢの阻害物質を含み、阻害物質は、RSL残基P1-P14のアミノ酸配列を模倣するペプチド、又はアンチトロンビンⅢに特異的に結合する抗体若しくは抗体断片であり、過度の出血により特徴づけられる臨床状態は手術、外傷及び内出血のうちの1つ又は複数であり、RSL残基P1-P14のアミノ酸配列を模倣するペプチドは、アミノ酸配列：

N H₂ - S e r - G l u - A l a - A l a - A l a - S e r - T h r - A l a - V a l - V a l - I l e - A l a - G l y - A r g - C O O H

10

からなるペプチドである、医薬。

【請求項 2】

阻害物質は、健常人由来のプール血漿に添加された場合に、トロンビン及び第Xa因子及び第IXa因子のうちの少なくとも1つに添加された際の血漿によるトロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性の低下を、阻害物質なしの同じ血漿によるトロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性の低下と比較して20%を超えて抑制し、好ましくは、トロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性は、発色基質を用いるアッセイで測定される、請求項1に記載の医薬。

【請求項 3】

20

遺伝性の出血性障害は血友病であり、好ましくは、対象は第VIII因子又は第IX因子に対する中和抗体を有する血友病患者である、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項4】

阻害物質は、予防的な第VIII因子又は第IX因子バイパス療法として使用される、請求項3に記載の医薬。

【請求項5】

抗体又は抗体断片は、アンチトロンビンIIIのRSL配列中のエピトープに特異的に結合し、好ましくは、アンチトロンビンIIIの中央のシートへのRSLの挿入を阻害する、請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項6】

アンチトロンビンIIIのRSL配列中のエピトープはRSL残基P1-P14のうちの1つ又は複数を含み、好ましくは、エピトープは、RSL残基P10周辺、RSL残基P5-P10、又はRSL残基P3-P8を含む、請求項5に記載の医薬。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明は、医学の分野に関し、特に血液凝固因子、その阻害物質、及び止血のためのその使用に関する。より詳細には、トロンビン活性を促進して血液凝固を刺激するための方法を開示する。本発明は、例えば、出血性障害（例えば血友病）による、又は手術若しくは外傷による、又は抗凝固薬の使用による過度の出血を治療又は予防するために、或いは内出血を止めるために使用することができる。

20

【発明の背景】

【0002】

血液凝固は、血管が損傷すると直ちにスイッチが入り、血管系が無傷のときはスイッチがオフになっている繊細なプロセスである。このプロセスが不正確に制御されると病変が生じる。出血性障害又は過度の出血は、血液凝固のスイッチの入り方が遅すぎるか弱すぎるとときに起こり、血栓性疾患は、血液凝固のスイッチの入り方が早すぎるか強すぎるとときに生じる。本発明は、血液凝固を刺激する新規な方法を開示するものであり、したがって、（過度の）出血により特徴づけられる疾患又は臨床状態に適用され得る。そのような状態としては、血友病A又はB、手術又は外傷に起因する出血、内出血（例えば、脳出血、胃腸出血）、又は抗凝固薬（例えば、ワルファリン、ヘパリン）の使用に基づく出血が挙げられる。

30

【0003】

血液の凝固は体液性応答及び細胞性応答を含む。前者は可溶性フィブリノーゲンの不溶性フィブリソームへの変換を導き、後者は血小板血栓の形成を導く。これらの応答は絡み合っている。例えば、体液性応答の間に形成された酵素トロンビンは血小板の強力な活性化因子であり、一方、活性化血小板の膜は、凝固因子複合体（これは効率的な凝固プロセスの要である。）を組み立てる役割を果たす。活性化された血小板血栓、フィブリソーム、並びに組み込まれた赤血球及び白血球が一緒になって血餅を構成する。本願は、血液凝固の体液性応答を促進するための新規の方法を扱う。そこで、まず体液性凝血応答について議論する。

40

【0004】

体液性凝血応答は、不活性な補因子及び酵素前駆体として循環している一連のタンパク質である凝固因子によって媒介される。これらの因子は一緒にになって血液凝固系を形成している。血液凝固の活性化は、不活性な酵素前駆体及び補因子がカスケード様の形式で連続的に活性化されることからなるプロセスを含む。各ステップでは、新たに形成された凝固プロテアーゼが次の因子の活性化を触媒する。活性化は、血液と膜タンパク質組織因子（TF）との接触により始まる。TFは通常、内皮細胞で発現されていないが、平滑筋細胞のような内皮下の細胞に豊富に存在している。それ故、内皮細胞層が破壊されると、血液がこの構成的に発現されたTFに曝露され、これが血液凝固を引き起こす。血液凝固系

50

の活性化中にいくつかの酵素 - 補因子複合体が形成され、この複合体は、細胞、特に内皮細胞及び活性化血小板の細胞膜に集まる。これらの酵素 - 補因子複合体の1つがTFと活性化第VII因子との複合体(TF - FVIIa)であり、この複合体では、FVIIaがタンパク質分解活性を有し、第X因子及び第IX因子(FX及びFIX)を活性化することができる。活性化FX(FXa)は活性化第V因子(FVa)と一緒にになってプロトロンビナーゼ複合体を形成し、この複合体は次いでプロトロンビンを活性化して、活性プロテアーゼであるトロンビンにする。TF - FVIIaは第IX因子をFIXaに変換することもでき、このFIXaは活性化第VIII因子(FVIIIa)と一緒にになってFVIIIa - FXIa複合体を生成する。この複合体中の活性プロテアーゼはFIXaであり、これはFVIIaと同様にFXを活性化することができる。

10

【0005】

適切な刺激(例えばTF)との接触があると、血液凝固系の活性化がTF - FVIIa複合体により開始され、FVIIIa - FIXa複合体の作用によって伝播し、FXIの活性化により増幅される(図1参照)。

【0006】

生理学的条件下において、多くの止血応答は、FXの十分な活性化(さらにはトロンビン生成)を確実にするために、このFIX-及びFVIII依存性の増幅を必要とする。このFVIII及びIXの必要性は、これらのタンパク質の遺伝性欠乏症である血友病A又はB(重度の出血性障害であり、それぞれFVIII又はFIXの欠乏に起因する。)の臨床症状により顕著に示される。

20

【0007】

血友病はX連鎖先天性出血性障害であり、概して、凝固FVIIIの欠乏(血友病A)又はFIXの欠乏(血友病B)に起因して生じる(Mannucci et al., N Engl J Med 2001; 344: 1773-1779)。この疾患の発生頻度は10,000人の男性の出生当たり約1人である。血友病Aの罹患率は、同じX連鎖遺伝性欠乏症である血友病Bの罹患率の約5~6倍である。臨床的に、血友病は、出血症状の重症度に応じて軽度、中等度、重度の血友病に分類される。重度の血友病患者は、幼児期の容易な打撲、(特に関節及び軟組織への)自発的出血、及び外傷若しくは手術後の過度の出血という病歴を有していることが多い。軽度の血友病患者は自発的出血エピソードを患つことはほとんどないが、大概は、外傷又は手術に起因する過度の出血を経験している。適切な凝固試験により診断が確実となり、患者が血友病A又はBのいずれに罹患しているかが明らかとなる。重度の血友病Aは、機能性FVIIIレベルが非常に低いかゼロ(正常レベルの<1%)であることによって特徴づけられ、一方、軽度の血友病では機能性FVIIIのレベルが正常レベルの5~15%である。

30

【0008】

血友病患者のオンデマンド及び予防的治療法は典型的には補充療法からなる。補充療法とは、患者の不完全な血液凝固系において、不足している血液凝固因子を補充することに基づくものである。したがって、血友病A及びB患者には、出血エピソードを治療又は予防するために、それぞれFVIII及びFIX濃縮物が注入される。しかし、欠乏因子の調製物で処置された血友病患者は、その欠失因子に対する中和抗体(阻害物質)が発生するリスクがある。欠失している凝固因子は、これらの患者にとって内在性のものではなく、その結果、免疫系がそれらの因子に対して寛容でなくなる。中和抗体の形成は、重度の血友病A患者の15~30%で起こり(Goudemand et al., Blood 2006; 107: 46-51; Gouw et al., Blood. 2007; 109: 4693-4697)、血友病B患者の1~3%で起こる。特にFVIII血漿レベルが正常レベルの<1%に至る重度の遺伝子欠損、例えば、遺伝子欠失又は逆位、ナンセンス及びフレームシフト変異を有する患者は、免疫系がFVIIIに寛容でないため、阻害物質を生じる場合がある。阻害物質の循環レベルが高いとき、患者は阻害物質の中和効果を解消するために大量の欠乏因子を必要とする。そのような高用量のFVIII療法は非常に費用がかかる。代替手段としてFVIIIバイパス療法が開発された。この

40

50

療法の根底にある原理は、FVIII / FIX複合体の欠乏がFVIII、IX及びXの活性化形態の使用によりバイパスされることである。そのようなFVIIIバイパス療法の例は活性化プロトロンビン・複合体濃縮物及び組換えFVIIaである(J Astermark et al., Blood. 2007; 109: 546 - 551; HR Roberts et al., Blood 2004; 104: 3858 - 3864; WK Hoots, Blood 2007; 109: 395 - 396)。これらのFVIII - バイパス療法の欠点は、オンデマンド療法にしか適用できないことである。

【0009】

認可されている唯一の組換えFVIIaバイパス療法は組換えFVIIa(rFVIIa; ノボセブン(NovoSeven)(登録商標), NovoNordisk, Copenhagen, Denmark)である。rFVIIaは、直接に又は組織因子と複合体を形成して、活性化血小板の表面上に露出した負に荷電したリン脂質に結合し、それにより損傷部位に対するFXの活性化を標的とすることによって止血を刺激する。あるいは、その効果は、FVIIに対するFVIIaの比率の増加によるものであり得る。rFVIIaは、阻害物質を有する患者の70~75%の出血を止める。このrFVIIa又は活性化プロトロンビン複合体を用いたFVIIaバイパス療法の限界は、費用が高いことと、半減期が2~3時間と短いために予防的療法として利用できることである。しかし、血友病の予防的処置を行えば、血友病性関節症が予防され、生活の質が改善する(Mancuso-Johnson et al., N Engl J Med 2007; 357: 535 - 44)。このように、FVII阻害物質を有する血友病患者への予防的FVIIaバイパス療法に対する、実現されていない医学的要求が存在している。本発明の目的は、そのような治療法を提供することである。

【0010】

いくつかの他の臨床状態は、過度の又は望まない出血、例えば、手術により誘発される出血、戦争又は交通事故による出血、内出血(例えば、脳出血、胃腸出血)、及び抗凝固剤(例えばワルファリン)の使用に関連する出血を伴う。これらの状態は、局所的に適用される止血剤(例えばフィブリント)又は全身的に投与されるrFVIIaによって治療し得る。しかし、rFVIIaを用いたこれらの状態の治療は、血栓・塞栓プロセスを引き起こして重篤な副作用をもたらすリスクがある(O'Connell et al., JAMA. 2006; 295: 293 - 298; Levi et al., N Engl J Med 2010; 363: 1791 - 1800)。この血栓・塞栓リスクは、おそらくrFVIIaが活性な凝固プロテアーゼであることと関係がある。循環血液にrFVIIaを注入すると、循環血液のいたるところで活性な凝固プロテアーゼが存在することになる。さらに、rFVIIaは、その薬力学的效果をモニターする簡単なアッセイ法がないために用量設定が難しい。

【0011】

本発明の目的は、手術、事故及び他の状態による過度の出血の治療及び予防のための新規の化合物及び方法を提供する。rFVIIaを用いる治療とは対照的に、本発明の新規の化合物及び方法は、オンデマンド療法だけでなく予防的治療法としても使用することができ、治療上必要な用量は、簡単かつ便利な臨床アッセイ法を用いて決定及びモニターすることができる。

【発明の概要】

【0012】

本発明は、過度の出血の治療及び予防のための方法であって、アンチトロンビンIII(AT)の阻害物質を出血患者又は出血のリスクのある患者に投与して機能的ATのレベルを低下させることを含む方法を提供する。AT阻害物質が、患者の出血を治療又は予防するための方法として記述されたことはないので、この方法は驚くべきかつ新規なものである。本発明は、血友病、手術、外傷、又は過度の出血が生じる他の状態(例えば、抗凝固剤の使用)において、また、内出血(例えば、脳出血、胃腸出血(例えば、静脈瘤による食道出血))の場合において適用し得る。また、本発明により開示される方法は、出血

10

20

30

40

50

のリスクのある患者の出血を予防するために使用することができ、例えば、血友病患者において、血友病患者の関節、筋肉及び／又は軟組織における出血を予防するために使用することができる。A T阻害物質での処置によって、そのような患者において出血を予防することができる。

【0013】

ある実施形態において、A T阻害物質は、A Tに結合して、A Tの機能を阻害し又はヒト又は動物におけるA Tのクリアランスを増加させる分子である。本発明の他の実施形態において、結合分子は、ペプチド、タンパク質、又は抗体若しくは抗体断片である。また、A Tに結合してその機能を阻害する他の分子（例えば化合物）も本発明の範囲内にある。
10

【0014】

本発明のある実施形態において、A T阻害物質は、A Tに結合してA Tの活性を阻害する、ヒト、ヒト化又は動物種由来のモノクローナル抗体又はその断片である。

【0015】

本発明の他の実施形態において、A T阻害物質は、A Tに結合してヒト又は動物におけるA Tのレベルを低下させる、ヒト、ヒト化又は動物種由来のモノクローナル抗体又はその断片である。

【0016】

本発明の他の実施形態において、A T阻害物質は、A Tの活性を阻害するポリクローナル抗体又はその断片である。
20

【0017】

本発明の他の実施形態において、A T阻害物質は、A Tに結合してヒト又は動物におけるA Tのレベルを低下させる、ヒト、ヒト化又は動物種由来のポリクローナル抗体又はその断片である。

【0018】

本発明の他の実施形態において、A T阻害物質は、A Tに結合してA Tの活性を阻害する非抗体分子（例えば、アプタマー、タンパク質、ペプチド、化合物）である。

【0019】

本発明の他の実施形態において、A T阻害物質は、A Tに結合してヒト又は動物におけるA Tのレベルを低下させる非抗体分子（例えば、アプタマー、タンパク質、ペプチド、化合物）である。
30

【0020】

本発明のいくつかの実施形態において、A T阻害物質は、A Tとその標的プロテアーゼとの相互作用に関与するA T上の部位に結合してそれを遮断する。本発明の他の実施形態において、A T阻害物質は、A T上の部位に結合し、それによって、ヘパリン又は他のグリコサミノグリカンによるA Tの機能的活性の増加を抑制する。

【0021】

本発明の好ましい実施形態において、A T阻害物質は、A Tの中央のシートへのA Tの反応部位ループの挿入を抑制し、その標的プロテアーゼによるA Tのタンパク質分解的不活性化を引き起こす。
40

【0022】

本発明の別の実施形態において、A T阻害物質は、F V I I Iが欠乏している血友病患者（F V I I Iに対する中和抗体を有していても有していないてもよい。）における出血を治療又は予防するために投与される。他の実施形態において、血友病患者は、F I X活性を欠乏している患者（F I Xに対する中和抗体を有しても有していないてもよい。）である。

【0023】

本発明の別の実施形態において、A T阻害物質は、F X Iが欠乏している血友病患者における出血を治療又は予防するために投与される。別の実施形態において、A T阻害物質は、F V I I I、F I X又はF X I以外の凝固因子が欠乏している患者の出血を治療又は
50

予防するために投与される。

【0024】

本発明はまた、血友病A患者においてFVIIIに対する阻害物質が生成する可能性を低減又は予防するための方法であって、AT阻害物質を投与して、FVIIIの必要性を低下させることを含む方法を提供する。さらに、本発明は、血友病B患者においてFIXに対する阻害物質が生成する可能性を低減又は予防するための方法であって、AT阻害物質を患者に投与することを含む方法を提供する。

【0025】

本発明はまた、非血友病患者の出血を治療又は予防する方法であって、(過度に)出血している患者にAT阻害物質を投与することを含む方法を提供する。すなわち、一実施形態において、本発明は、過度の出血により特徴づけられる臨床状態(例えば、手術、外傷、内出血)の予防又は治療に使用するためのAT阻害物質に関する。

10

【0026】

上述の本発明の実施形態によれば、AT阻害物質の止血量が患者に投与される。前記止血量は好ましくは有効止血量である。

【0027】

ある実施形態において、血友病患者に投与されるべきAT阻害物質の用量は、血漿中で欠乏した凝固因子を補うことのできるAT阻害物質の濃度を確定するために使用されるインビトロアッセイであって、次のステップa)~d)を含むアッセイから計算される。a)血友病患者由来の血漿に、組織因子及びCa²⁺の希釈液を複数の濃度で添加するステップであって、凝固時間は、血漿中で欠乏した凝固因子(例えば、FVIII又はFIX)の添加に依存する、ステップ；b)前記凝固因子の不存在下で血友病血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成を測定するステップ；c)0.01~1U/ml(1U/mlは、正常ヒトプール血漿中に存在する因子の量である。)の濃度を達成するように添加された欠乏凝固因子の存在下で、血友病血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成を測定するステップ；d)前記凝固因子の不存在下かつ種々の濃度のAT阻害物質の存在下で、血友病血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成(並びにATレベル)を測定するステップ。AT阻害物質の投与によって達成される機能性ATの所望のレベルは、種々のAT阻害物質レベルでのトロンビン生成及びフィブリン形成を、種々の欠乏因子レベルで観察されるトロンビン生成及びフィブリン形成と比較することによって推定することができる。

20

【0028】

別の実施形態において、阻害物質を有する血友病患者に投与されるAT阻害物質の用量は、血漿中で欠乏した凝固因子を補うことのできるAT阻害物質の濃度を確定するために使用されるインビトロアッセイであって、次のステップa)~c)を含むアッセイから計算される。a)FVIII又はIXの阻害物質を有する血友病患者由来の血漿に、組織因子及びCa²⁺の希釈液を複数の濃度で添加するステップであって、凝固時間は、阻害物質を有する血友病患者由来の血漿中の前記凝固因子(例えば、FVIII又はFIX)の添加に依存する、ステップ；b)阻害物質を有する血友病血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成を測定するステップ；c)正常プール血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成を測定するステップ。トロンビン生成及びフィブリン形成を正常化するAT阻害物質の用量は、生体内投与の標的レベルに応じて選択することができる。その後、生体内で使用されるAT阻害物質の用量は、AT阻害物質を患者に投与し、循環血液中の機能性ATレベルを測定することによってモニターされる。

30

【0029】

別の実施形態において、本発明は、手術、外傷、抗凝固剤の使用又は他の理由により出血している非血友病患者由来の血漿におけるフィブリン形成及びトロンビン生成並びに活性を刺激するAT阻害物質の能力を推定するための方法であって、a)患者の血漿に組織因子の希釈液を供給するステップと、b)前記血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成を測定するステップと、c)0~1U/ml(正常レベルの0~100%)のAT

40

50

活性の低下を引き起こす用量の A T 阻害物質の存在下でフィブリン生成又はトロンビン生成を測定するステップと、d) A T 阻害物質の非存在下又は存在下で前記血漿におけるフィブリン生成又はトロンビン生成を測定して、前記血漿におけるフィブリン形成又はトロンビン生成を増加させる A T 阻害物質の能力を確定するステップと、を含む方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

別の実施形態では、生体内で使用される A T 阻害物質の用量は、 A T 阻害物質を患者に投与し、循環血液中の機能的 A T レベルを測定することによってモニターされる。

【 0 0 3 1 】

一態様において、本発明は、出血患者又は出血のリスクのある患者を治療する方法であって、患者に A T 阻害物質を投与して、正常レベルの 80% 未満、好ましくは 20 ~ 80%、好ましくは正常レベルの 20 ~ 60%、より好ましくは正常レベルの 40 ~ 60%、さらに好ましくは正常レベルの約 50% の機能性 A T の血漿濃度を得ることを含む方法を提供する。すなわち、好ましくは、阻害物質は、 A T の機能的活性を正常な A T レベルの少なくとも 90、80、50、20、10、5、1、0.5、0.2、0.1% に低下させる量で投与される。本明細書において、正常な A T は、好ましくは健常人由来のプール血漿におけるレベルと理解される。

10

【 0 0 3 2 】

ある実施形態において、本発明は、出血エピソードを有する非血友病患者を治療する方法であって、患者に A T 阻害物質を投与して、正常レベルの 80% 未満、好ましくは 20 ~ 80%、好ましくは正常レベルの 20 ~ 60%、より好ましくは正常レベルの 40 ~ 60%、さらに好ましくは正常レベルの約 50% の機能的 A T の血漿濃度を得ることを含む方法を提供する。ある実施形態において、投与される A T 阻害物質の用量は、機能的 A T の血漿レベルについてのアッセイを用いてモニターする。

20

【 0 0 3 3 】

別の態様において、本発明は、 F V I I I 欠乏を有する患者を治療する方法であって、最適止血レベル未満の F V I I I が A T 阻害物質と組み合わせて患者に投与されて、有効止血量の混合物を生成させる方法を提供する。ある実施形態において、 F V I I I は、 A T 阻害物質と組み合わせて、 F V I I I に対する免疫応答が患者において惹起されない十分に低いレベルで投与される。

30

【 発明の詳細な説明 】

【 0 0 3 4 】

生体内での血液凝固の過剰な活性化はいくつかの阻害物質によって制御されている。主たる阻害物質はアンチトロンビン I I I (A T) である。 A T は、セリンプロテイナーゼ阻害物質、すなわちセルピンのタンパク質ファミリーに属する。これまで、 A T の阻害が、血液凝固を促進するための治療的アプローチを構成することを提示又は示唆した者はいなかった。本発明は、 A T の阻害が、血友病又は他の出血性障害を有する患者への治療的選択肢を構成するという意外な知見を開示する。 A T の阻害物質（例えば阻害抗体）を出血患者又は出血のリスクのある患者に投与することにより、 A T レベルが低下し、より多くのトロンビンの生成とトロンビン活性の延長が可能となり、より多くのフィブリンの生成とより効率的な血餅形成がもたらされる。

40

【 0 0 3 5 】

発明の原理 :

A T は、いくつかの凝固プロテイナーゼ、特に、トロンビン及び F X a 、並びに F V I I a 、 F I X a 及び F X I a も阻害する。生体内で生成されるトロンビンの量の約 80% が A T により中和されると推定されている。機能性 A T のレベル低下（例えば、遺伝的ヘテロ接合性欠損によるもの）により、トロンビン、 F X a 、 F I X a 、 F X I a 及び F V I I a の阻害が少くなり、より多くのフィブリンが生成する。注目すべきことに、 A T レベルの低下の際に、トロンビン活性の半減期が延長されるだけでなく、より多くのトロンビン分子が生成されることとなるが、その理由は、プロトロンビンからトロンビンを生

50

成する凝固プロテアーゼである FXa の半減期も延長されるためである。 FXA 活性の延長により、 FXa 1 分子当たりのプロトロンビン分子からトロンビンへの変換数が増加する。したがって、 AT レベルを低下させることによる凝固促進効果は、トロンビンの半減期の延長と、生成されるトロンビン量の増加によるものである。これは、 r FVIIa を用いる治療法のような他のすべての FVIIa バイパス形式がトロンビンの生成を増加させるにすぎず、トロンビンの半減期への効果はなかったことと対照的である。出血患者又は出血のリスクのある患者における AT 阻害は、文献に記述されたことのなかった新たな治療原理を構成するものである。

【 0036 】

血友病の主な欠点は、 FVIIa / FIX ループを介するトロンビン生成の増幅がないことである（図 1 参照）。但し、一部のトロンビンは、 FVIIa / TF 複合体による FX の直接活性化経路は無傷であるためである。血漿において、トロンビンは AT により 60 ~ 90 % 阻害される。さらに、 FXa 及び FIXa の活性も AT により阻害される。本発明の一実施形態は、 FXa 及びトロンビンの AT による阻害を低下させるために治療有効量の AT 阻害物質を投与することである。結果として、両方のプロテアーゼの半減期が延長され、 FXa 1 分子当たりのプロトロンビン分子からトロンビンに変換される数がより大きくなり、トロンビン 1 分子のフィブリノーゲン分子からフィブリンに変換される数がより大きくなる。このように、機能的 AT レベルを低下させることによって、より多くのトロンビンが生成され、トロンビン活性の半減期が延長される。これは、 FVIIa / FIX ループの機能低下の結果血友病で生じるトロンビンの生成低下を補うものである。注目すべきことに、この AT 阻害による二重の効果、すなわち生成されるトロンビン分子数の増加とトロンビン活性の延長という効果は、 AT 阻害のコンセプトに特有のものであり、他の FVIIa バイパス法のいずれとも共通しない。これにより、 AT 阻害は、原理的には最も有効な FVIIa バイパスアプローチとなる。

【 0037 】

血液凝固の活性化は活性プロテアーゼを必要とすることから、 AT の阻害自体は血液凝固の活性化を引き起こすものではない。 TF と FVIIa (a) との相互作用、及び続く FIX 及び FX の活性化により、 TF の発現部位において活性プロテアーゼが生成する（図 1 参照）。したがって、 AT 阻害物質の存在下では機能的 AT レベルの低下により凝固が生じ易くなるが、この凝固形成は、主として（完全とまではいかないが）、 TF が血液に曝露された身体の場所（例えば、損傷した血管壁）に限定されるであろう。これは、活性プロテアーゼとして投与された組換え FVIIa が循環系全体にわたって適用されることとなる、組換え FVIIa での処置とは対照的である。

【 0038 】

発明の態様：

すなわち、第 1 の態様において、本発明は、医薬として使用するための AT 阻害物質に関する。阻害物質は好ましくは後述の AT 阻害物質である。

【 0039 】

第 2 の態様において、本発明は、後天性若しくは遺伝性の出血性障害（凝固性低下）に罹患している対象又は過度の出血により特徴づけられる臨床状態を有する対象における出血の治療及び予防に使用するための AT 阻害物質に関する。あるいは、この態様において、本発明は、後天性若しくは遺伝性の出血性障害（凝固性低下）に罹患している対象又は過度の出血により特徴づけられる臨床状態を有する対象における出血の治療及び予防用の医薬の製造のための AT 阻害物質の使用に関する。この態様において、 AT 阻害物質は好ましくは後述の阻害物質である。同様に、後天性若しくは遺伝性の出血性障害（凝固性低下）に罹患している対象又は過度の出血により特徴づけられる臨床状態を有する対象の出血の治療又は予防は好ましくは後述の通りである。

【 0040 】

さらなる態様において、本発明は、後天性または遺伝性の出血性障害（凝固性低下）に罹

10

20

30

40

50

患している対象又は過度の出血により特徴づけられる臨床状態を有する対象の出血の治療又はリスク低下のための方法であって、対象に有効量の A T 阻害物質を投与するステップを含む方法に関する。 A T 阻害物質は好ましくは後述の阻害物質である。同様に、後天性若しくは遺伝性の出血性障害（凝固性低下）及び過度の出血により特徴づけられる臨床状態は好ましくは後述の通りである。

【 0 0 4 1 】

別の態様において、本発明は、化合物を後述の A T 阻害物質として同定するための方法に関する。

【 0 0 4 2 】

アンチトロンビン I I I (A T) の阻害物質 :

アンチトロンビン I I I (A T) は、セルピン（セリンプロテアーゼ阻害物質）のタンパク質ファミリーに属する 5 8 k D a の糖タンパク質である。成熟したタンパク質は 4 3 2 個のアミノ酸からなり、4 つの糖鎖付加部位を有する。 A T は肝臓の実質細胞で產生される。その血漿濃度は約 0 . 1 ~ 0 . 1 5 m g / m l 又は 3 . 5 μ M である。 A T は、2 ~ 3 日の明確な半減期で循環血液から消失する。抗原性及び活性レベルは、正常なレベルに対する割合（%）として又は U / m l [1 U はヒトプール血漿における量である。] で表される。 A T は - 形態及び - 形態の両方で発現される。 - A T は A T の 9 0 % を構成し、4 つすべての位置で糖鎖付加されている。 - A T は A T の 1 0 % を構成するにすぎないが、ヘパリンに対する高い親和性を有し、1 つの位置 (N 1 3 5) で糖鎖付加されておらず、 - A T より全体的に高い抗凝固効果を示す。

【 0 0 4 3 】

A T は血液凝固経路の最も強力な生理学的阻害物質である。その名称から示唆される通り、 A T はトロンビンを阻害する。さらに、 A T は、すべての他のタンパク質分解性血液凝固因子（例えば、 F I X a 、 F X a 、 F X I a ）を阻害する能力を有する。しかし、その主要な抗血液凝固活性は F X a 、 F I X a 及びトロンビンの制御による。 A T は、生体内でトロンビンに対して 5 0 ~ 8 0 % 又は最大 8 0 % の阻害効果を示すと推定される。

【 0 0 4 4 】

A T の作用は、グリコサミノグリカン（例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸塩）によって増強され、 A T の機能的活性は 2 ~ 3 1 0 g 増加し得る。ヘパリンは、いくつかの硫酸化二糖類を有するタンパク質骨格で構成される。粗調製物は、3 ~ 4 0 k D a の範囲の分子量を有するヘパリン分子を含有する。ヘパリン中の特有の五糖配列が、 A T に高い親和性で結合するために重要である。生体内では、内皮上のヘパラン硫酸塩、及び内皮関連マスト細胞小粒から放出されるヘパリンがおそらく A T の補因子の主な供給源である。

【 0 0 4 5 】

ヘパリンは、 A T によるプロテアーゼ阻害を加速するために 2 つの異なるメカニズムを用いる。1 つのメカニズムは、反応部位ループ (R S L ; 図 2 では、このループは反応中心ループ (R C L) と呼ばれる（図 2 参照）。) を標的プロテアーゼにアクセスし易くすることであり、このメカニズムは F I X a 及び F X a に対する阻害活性の増強に寄与する。もう一つのメカニズムは、ヘパリンが、 A T 及びその標的プロテアーゼ、特にトロンビンに鋳型を提供することである。抗血液凝固活性に加えて、 A T は抗炎症及び抗血管形成機能を同様に有する。これらはここでは議論しない。

【 0 0 4 6 】

A T の生理学的重要性は、完全に A T を欠損させたノックアウトマウスで示されてきた。これらのマウスは血栓症及び出血により子宮内で死に至る (Ishiguro et al . , J Clin Invest . 2 0 0 0 ; 1 0 6 : 8 7 3 - 8 7 8) 。また、ヒトにおいても、 A T の完全な欠損は致命的な影響を与えるものと推測される。その理由は、ヘテロ接合性の欠損が 2 , 0 0 0 ~ 5 , 0 0 0 人に 1 人の割合で生じるのに対し、 A T の完全な欠損はヒトにおいて記録されたことがないためである。ヘテロ接合性の A T 欠損者では血栓 - 塞栓障害のリスクが増加している (PS McLean et al . , Drugs 2 0 0 7 ; 6 7 : 1 4 2 9 - 1 4 4 0) 。

10

20

30

40

50

【0047】

A Tによる凝固プロテアーゼの阻害効果が、精製タンパク質を正常血漿濃度で有する系で検討されてきた(van't Veer et al., J Biol Chem. 1997; 272: 4367 - 4377)。A Tの正常レベルでの存在は、F V I I a / T Fを用いて反応を開始させる際のトロンビン生成の開始段階に影響を与えず、また、F V活性化にも影響を与えたかった。A Tが存在する場合のトロンビン形成速度は、阻害されていない反応における速度の30%に低下し、形成されたトロンビンの量はその生成後に急速に減少した。本発明は、A Tレベルの低下が、重度の出血があるか又はそのリスクのある患者の治療原理として使用可能であることを開示する。

【0048】

A Tは、動物、植物、細菌及びウイルスにおいて天然に存在するf/eで広く見出されるセルピン(セリンプロテアーゼ阻害物質)のタンパク質スーパーファミリーに属する(概観についてはRuby HP Law et al., Genome Biology 2006; 7: 216.1 - 216.11を参照のこと)。多くのセルピンが、良く知られた名称を有しており、その名称の多くが、発見につながった機能に言及している。A Tなどのいくつかのセルピンでは、従来の名称が、多かれ少なかれ、それらの主な生物学的機能を包含しているが、他のいくつかのセルピンでは、この点で従来の名称が誤解を招きやすいものとなっている。例えば、1-抗トリプシン及び1-抗キモトリプシンは、それぞれ消化酵素トリプシン及びキモトリプシンを阻害する能力により発見されたが、その生体内での主要な機能は、それぞれ好中球プロテアーゼ(エラスターーゼ、プロテアーゼ3)及びカテプシンGを阻害することである。セルピンは16のクレード(A-P)に分類される。各セルピンの組織的名称はセルピンXyであり、ここで、Xはクレード、yはクレード内の数を表す。この分類によれば、A TはセルピンC1である。ヒトの遺伝子は36種のセルピンをコードしている。多くのセルピンはプロテアーゼ阻害物質として作用するが、一部のセルピンは異なる機能を有する。

【0049】

セルピンの基本構造は約400個のアミノ酸で構成され、一部のセルピンは、大きなN末端、C末端、又は内部挿入ループを有する。多くのセルピンは、それらの機能を変化させる翻訳後修飾(例えば、糖鎖付加、硫酸化、リン酸化、酸化)を受ける。セルピンは、9個の-ヘリックス(A-I)及び3つのシート(A-C)で構成される-サンドウィッチの束を含む高度に保存された3-D構造を共通して有する(図2参照)。セルピンのもう一つの典型的な特徴は反応部位ループ(RSL)であり、RSLはタンパク質の本体部分から突き出て、ある種の餌のようにプロテアーゼに提示される。RSLは、典型的には、N末端のP17からC末端のP3'にわたる20個のアミノ酸で構成される(この命名法に従えば、P1-P1'が切断可能な結合(プロテアーゼで切断され得る。)を構成する)。セルピンの通常の天然状態では、シートA、すなわち中央のシートは5つのストランドで構成されており、RSL(ストランド5AのC末端からストランド1CのN末端に架橋)が露出されている。注目すべきことに、この立体構造の熱力学的安定性は最適ではなく、中央のシートへのRSLの組み込みによってより安定な構造が生じる。この安定な立体構造は、(非標的)プロテアーゼによるRSLのタンパク質分解の際に生ずる(この場合、プロテアーゼは、中央のシートへのRSLの挿入が完了する前にセルピンから放出される。)か、あるいは標的プロテアーゼとの複合体形成の際に生じる(この場合、挿入が終了する時点で、プロテアーゼは、P1位置のアミノ酸残基に依然として共有結合的に結び付けられている)。この挿入の結果として、活性部位セリンは、プロテアーゼの活性部位における位置からわずかに引き抜かれ、プロテアーゼがP1残基から離れる可能性が防がれる。後者の場合、立体構造的に変化したセルピンとその標的プロテアーゼとの間で共有結合的に連結した複合体が残る。

【0050】

セルピンと標的プロテアーゼとの相互作用は化学量論的である。この反応は次のように記述することができる。

10

20

30

40

50



[P = プロテアーゼ ; S = セルピン ; S * = 変化した安定な立体構造を有するセルピン]

【 0 0 5 1 】

プロテアーゼによる基質として R S L (図 3 の R C L) の配列が認識されると、セルピンの立体構造が依然として天然の状態 (S) である可逆的な複合体 (ミカエリス複合体としても知られる。) が形成される。次の段階において、プロテアーゼは、アミノ酸残基 P 1 位置と P 1' 位置との間のペプチジル結合の切断を開始し (非標的プロテアーゼの場合、 R S L における他のペプチジル結合も同様に切断され得る) 、エネルギー的に最も低い立体構造が生じるように、 R S L の N 末端部分がセルピンの中央の シートに挿入される。プロテアーゼが P 1 から離れる前に挿入が完了する場合、プロテアーゼの活性部位が歪められ、プロテアーゼのタンパク質分解反応はすぐに中断される (図 3 の立体構造 c) 。 10

【 0 0 5 2 】

これにより、プロテアーゼの活性部位がセルピンの R S L に共有結合的に捕えられ、セルピンが安定な立体構造 (S *) をとる安定な複合体が生じる。プロテアーゼが加水分解反応を終えた時点で挿入がまだ完了していない場合、プロテアーゼは活性な酵素として離れ、不活性なセルピンでは、切断された R S L が中央の シートに挿入される (図 3 の立体構造 d) 。必須となる R S L - 活性部位の接触がミカエリス複合体の形成に大きく寄与するが、分子の他の部位もまた関与する。

【 0 0 5 3 】

A T の場合、セルピンと、プロテアーゼであるトロンビン、 F X a 及び F I X a と、の間で共有結合複合体が形成され、ある程度、 F X I a 及び F X I I a も形成され得る。これらのプロテアーゼの阻害効率は、速度定数、特に二次速度定数で記述することができる。これらの定数を表 1 に示す。 20

【 0 0 5 4 】

【 表 1 】

表1: いくつかの標的プロテアーゼでのATの阻害定数、及び
これらに対するグリコサミノグリカンの影響

(after: Rau et al., J. Thromb. Haemost. 2007;5 (Suppl.1):102-115)

標的プロテアーゼ	補因子	二次速度 $k_2(M^{-1}s^{-1})$
トロンビン	--	$7.5 \times 10^3, 1 \times 10^4$
	UFH	$2 \times 10^7, 4.7 \times 10^7$
	LMWH	5.3×10^6
	五糖	2×10^4
第Xa因子	--	$2.5 \times 10^3, 6 \times 10^3$
	UFH	$5 \times 10^6, 6.6 \times 10^6$
	LMWH	1.3×10^6
	五糖	7.5×10^5
第IXa因子	--	$1.3 \times 10^2, 5 \times 10^2$
	UFH	$8 \times 10^6, 1.75 \times 10^6$
	LMWH	3.7×10^5

UFH: 非断片化ヘパリン; LMWH: 低分子量ヘパリン

【 0 0 5 5 】

表 1 から明らかなように、 A T の阻害活性はグリコサミノグリカン (例えはヘパリン) 又は合成五糖の存在によって増強される。ヘパリン存在下の A T によるプロテアーゼの阻害増強は 2 つの異なるメカニズムによりもたらされる。 1 つは中央の シート A からの R 50

S L の N 末端の放出である。この R S L の「解放」は F I X a と F X a の阻害増強を説明するが、トロンビンの阻害増強は説明しない。トロンビン阻害増強はいわゆる鋳型メカニズムに起因するもので、このメカニズムは、ヘパリンが鋳型として作用し、トロンビンと A T の両方に最適位置で結合し、A T によるトロンビンの最大阻害が可能になることを意味する。

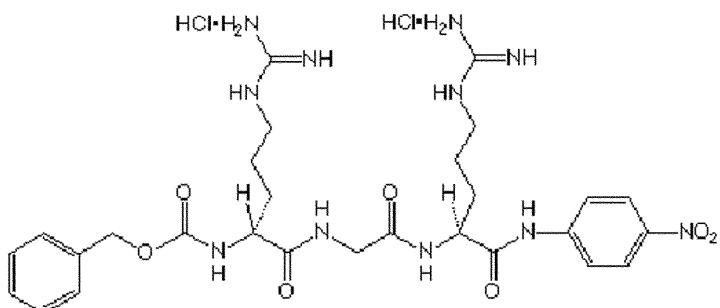
【 0 0 5 6 】

原則として、薬学的に許容される A T 阻害物質はいずれも本発明で使用可能である。本発明での使用に適した A T 阻害物質は、血漿（好ましくはヒト血漿、より好ましくは健常人由来のプール血漿）に添加されたときに、（好ましくは、第 X a 因子、トロンビン、又は A T と相互作用する任意の他のプロテアーゼ（例えば第 I X a 因子）を用いて測定される） A T の活性低下を引き起こす阻害物質であることが好ましい。阻害物質は、A T の活性を、正常な A T レベルの少なくとも 90、80、50、20、10、5、1、0.5、0.2、0.1 %まで低下させることが好ましい。本明細書において、正常な A T は、健常人由来のプール血漿におけるレベルと理解される。あるいは、阻害物質は、A T の活性を、阻害物質添加前の A T レベルの少なくとも 90、80、50、20、10、5、1、0.5、0.2、0.1 %まで低下させる。

【 0 0 5 7 】

A T の阻害は、好ましくは、A T によって通常阻害されるタンパク質分解酵素（例えば、ヒト又はウシ由来のトロンビン、第 X a 因子又は第 I X a 因子）に添加した際の血漿における A T の効果を阻害物質ありと阻害物質なしとで比較することによって測定される。すなわち、好ましくは、阻害物質は、血漿（好ましくはヒト血漿、より好ましくは健常人由来のプール血漿）に添加された場合に、（単離）トロンビン、（単離）第 X a 因子及び（単離）第 I I a 因子のうちの少なくとも 1 つに添加された際の血漿によるトロンビン、第 X a 因子及び第 I I a 因子のうちの少なくとも 1 つの活性の低下を、阻害物質なしの同じ血漿によるトロンビン及び第 X a 因子のうちの少なくとも 1 つの活性の低下と比較して 10、20、50、80、90、95、99、99.5、99.8、99.9 %を超えて抑制する。好ましくは、トロンビン及び／又は第 X a 因子の活性は、http://www.practical-haemostasis.com/Thrombophilia%20Tests/at_assays.html 又は Beeck et al., Blood Coagulation Fibrinolysis 2000; 11: 127-35 に記載の発色基質を用いるアッセイで測定される。第 X a 因子に対する適切な発色基質は、例えば、下記式を有する S - 2765, Z - D - Arg - Gly - Arg - pNA . 2 HCl である。

【 化 1 】



【 0 0 5 8 】

A T 活性に関するアッセイは、本明細書において、「A T の阻害を評価するための機能的 A T レベルの決定」の項でさらに記述される。

【 0 0 5 9 】

本発明で使用するために好ましい A T 阻害物質は、a) アンチトロンビン I I I の中央の シートへ挿入可能な化合物、b) アンチトロンビン I I I に特異的に結合し、アンチ

10

20

30

40

50

トロンビンⅡIの中央のシートへのRSLループの挿入を抑制又は遅延するアプタマー、c)ATに特異的に結合する抗体又は抗体断片、からなる群から選択される阻害物質である。そのような阻害物質については以下でさらに説明される。

【0060】

ATのペプチド阻害物質：

本発明の一実施形態において、例えば出血している患者のトロンビン形成及びトロンビン活性を増強するために使用可能なAT阻害物質の一クラスは、RSL残基P1-P14の配列を模倣するペプチドがATの中央のシートに挿入できるという観察に基づくものである。中央のシートへのペプチドの挿入は分子自体のRSLの挿入を抑制する。中央のシートへのRSLの挿入はセルピンの阻害機能に不可欠であり（図2及び3参照）、RSLペプチドとインキュベートされるATは標的プロテアーゼ（例えばトロンビン）に対する基質に変換される。言い換えると、ATとのインキュベーションにおいて、ATのRSLアミノ酸配列を模倣したペプチドがATの中央のシートに結合して挿入し、ATを標的プロテアーゼの基質に変換する（図4参照）。ATのRSLのP1-P14の配列を模倣するペプチドの効果は、I Bjork et al., J. Biol. Chem. 1992; 267: 1976-1982に記述されている。したがって、この実施形態に従う好ましいAT阻害物質は、RSL残基P1-P14のアミノ酸配列を模倣するペプチド又はペプチド模倣体である。

【0061】

このペプチドの好ましい配列は次の通りである。

NH₂-Ser-Glu-Ala-Ala-Ala-Ser-Thr-Ala-Val
-Val-Ile-Ala-Gly-Arg-COOH

【0062】

注目すべきことに、過度の出血を有する患者の治療法として、ATのRSL配列を模倣するペプチドを治療的に使用することは、これまで誰からも主張又は示唆されなかった。そのようなペプチドは、上記配列を有するペプチド、又は同じ配列を有するが、薬物動態特性を改善するために他のタンパク質配列、1若しくは複数のポリエチレングリコール（PEG）分子又は他の分子に結合しているペプチドであり得る。さらに上記配列の変化形でATに結合可能なペプチドも本発明の範囲内にあるものとする。

【0063】

さらに、ATに結合し、RSLループの挿入を抑制又は遅延してATを不活性化し、それにより、トロンビン及び他の凝固プロテアーゼに対する阻害活性を低下させる化学物質又は他の化合物（例えばアプタマー）も本特許の範囲内にあるものとする。

【0064】

ATの抗体阻害物質：

別の実施形態では、本発明で使用するAT阻害物質は、ATに対するポリクローナル及びモノクローナル抗体（ヒト、マウス、ヒト化マウス、ラクダ科などの他の動物種由来）又はそれらの断片を含む。本明細書における特定の実施例では、ヒトATに対するポリクローナル抗体が、血漿に添加された場合に血漿におけるAT活性を完全に遮断することを実証する。

【0065】

C1阻害物質（セルピンの1種でもあり、ATと構造的な相同性を有し、後天性のC1阻害物質欠乏症の原因となる。）を中和し、不活性化するモノクローナル自己抗体の研究により、これらの抗体が、P10'周辺のRSL配列の近くに位置するエピトープを認識することが明らかにされた（S He et al., J. Immunol. 1996; 154: 2009-2013）。これらの抗体は、おそらくは中央のシートへのC1阻害物質のRSLの挿入を妨げる（図4の右側パネルも参照）ことによってC1阻害物質を標的プロテアーゼの基質とする（S He et al., Molecular Medicine 4: 119-128, 1998）。ATの相同配列に対する抗体又はその断片は、標的プロテアーゼとの相互作用の際にATを不活性化するために使用される。

10

20

30

40

50

P 10周辺の A T の R S L 配列に対する抗体又はその断片はまた、標的プロテアーゼと相互作用すると、中央の シートへの R S L の挿入を阻害してセルピンを基質にする。実際、A T の R S L の P 3 - P 8 位のアミノ酸を含むエピトープを認識するある抗体は、トロンビンとインキュベートさせると A T を基質にすることが示されている (S A s a k u r a et al . , J Biol Chem 1990 ; 265 : 5135 - 6) 。さらに、A T を阻害するが、阻害のメカニズムは明らかになっていない他のモノクローナル抗体も文献に記載されている (P H e r i o n et al . , Blood 1985 ; 65 : 1201 - 7 ; S K n o l l e r et al . , Eur J Bioch 1989 ; 180 : 319 - 27) 。しかし、出血の治療又は予防に対するそのような抗体の治療的能力は検討されてこなかった。本発明は、そのような抗体が、血友病患者又は他の理由による出血エピソードを有する患者の出血を阻止又は予防するために使用し得ることを開示する。A T の中央の シートへの R S L の挿入を妨げることによって A T を阻害するすべての抗体（完全ヒト抗体、ヒト化抗体、動物種由来の抗体、脱免疫された若しくはされていない抗体）又はその断片が本発明の範囲内に入る。

【 0 0 6 6 】

すなわち、本発明の好ましい阻害物質は、A T の R S L 配列中のエピトープに特異的に結合し、好ましくは A T の中央の シートへの R S L の挿入を阻害する抗体又は抗体断片である。より好ましくは、A T の R S L 配列中のエピトープは R S L 残基 P 1 - P 14 のうちの 1 つ又は複数を含み、好ましくは、前記エピトープは、R S L 残基 P 10 周辺、R S L 残基 P 5 - P 10 、又は R S L 残基 P 3 - P 8 を含む。

【 0 0 6 7 】

上述の R S L ペプチドの配列に対する抗体は、これらの配列を含むペプチド（キャリアタンパク質に結合していても結合していないてもよい。）で免疫を行うことによって作製される。キーホールリンペットヘモシニアン（K L H）を結合させたペプチドが、ペプチド配列に対する抗体を生成するための抗原として一般的に使用されている。しかし、他のキャリアタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（B S A）も使用可能である。さらに、上記ペプチド配列の変異体も、得られる抗体が A T に結合する限り免疫に使用できる。

【 0 0 6 8 】

A T 阻害抗体を作製するための好ましい戦略は、A T の R S L のアミノ酸配列を有するペプチドが結合した K L H を用いて適切な宿主を免疫することである。ペプチドは、商業的又は非商業的な提供者から入手してもよく、又は当技術分野で周知の手順に従って作製してもよい。また、市販のペプチド合成装置もこの目的のために使用できる。ペプチドは、よく確立された方法（例えば、配列の C 末端システインの導入による方法）を介して K L H に結合される。別の方では、結合試薬としてグルタルアルデヒドを使用する。いくつかの営利的企業は、K L H - ペプチド結合体の作製を顧客へのサービスとして提供している。そのような K L H - ペプチド結合体は適切な宿主の免疫に使用できる。

【 0 0 6 9 】

好ましい実施形態において、K L H はキャリアタンパク質として使用され、R S L 配列（上記参照）を含むペプチド又は A T の R S L の配列 P 5 ' - P 10 を含むペプチドは、C 末端での付加的なシステイン残基の導入を介して K L H に結合される。

【 0 0 7 0 】

種々の免疫プロトコルを使用することができ、例えば、静脈内、皮下又は腹腔内の注射と、その後の 1 又は複数回の追加免疫が挙げられる。適切なアジュvantはフロイントアジュvantである。適切な免疫手順は、K L H - ペプチド（濃度は、宿主動物に応じて 10 ~ 500 マイクログラムの範囲であり得る。）を完全フロイントアジュvantと混合して用いて過免疫を行うことである。混合物は皮下注射する。注射は、不完全フロイントアジュvantと混合させた同じ K L H - ペプチド調製物を用いて 2 ~ 5 回繰り返す。血液サンプルを、3 回目、4 回目、5 回目の注射後 1 週間の動物から採取し、A T に対する抗体の存在についてスクリーニングする。

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい実施形態において、ATに対するモノクローナルマウス抗体は、ハイブリドーマ技術を用いて作製される。モノクローナル抗体は、当業者によく理解されている技術を用いて他の種々の方法で製造することができる。これらの技術の詳細は、(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., Cold Spring Harbor Publications, p. 726, 1988)において、又は(Campbell, A. M. "Monoclonal Antibody Technology Techniques in Biochemistry and Molecular Biology," Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984)若しくは(St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35: 1-21, 1980)に記載されている。10

【0072】

ヒトATに対する抗体を分泌するハイブリドーマは、抗体の存在について培養上清などを分析することによって同定することができる。好ましいスクリーニング法は次の2つの連続するステップを含む。第1のステップは、ATに対するmAbを分泌するハイブリドーマの同定であり、第2のステップは、ATの機能的活性を阻害するmAbの能力の測定である。

【0073】

抗ATモノクローナル抗体の存在についてハイブリドーマ上清をスクリーニングするにはELISAが使用される。ELISAは以下のように実施することができる。精製したヒト血漿AT(又は組換えヒトAT)をコーティングに使用する(リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)[PBS]中2μg/ml; 100μl/ウェル)。次いで、残余の非特異的結合部位を、PBS/0.1%(w/v)Tween 20(PBS-T)に0.2%(w/v)ゼラチンを含有させたもの(PBS-TG)を用いて、室温で30分間インキュベートして遮断する。その後、洗浄(PBS-Tを用いて5回)の後、プレートを、80μlのPBS-TGと共に20μlのハイブリドーマ上清で、37℃で60分間インキュベートする。最後に、結合したマウス抗体を、ペルオキシダーゼ結合ポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体での37℃、120分間のインキュベーションによって検出する。最後に、プレートを蒸留水で洗浄し(5回)、3, 5, 3', 5' - テトラメチルベンジンで発色させる。30

【0074】

あるいは、抗AT抗体は放射免疫アッセイで測定される。例えば、抗C3抗体の検出に関してHack et al., J. Immunol. 1988; 141: 1602-9に記載されている方法と同様の方法を用いて測定される。

【0075】

ATに対する抗体の、ATの機能的活性への効果を評価するために、陽性ハイブリドーマを限界希釈法によりサブクローニングして増殖させる。次いで、抗体を、ハイブリドーマ培養上清からプロテインG-アフィニティクロマトグラフィによって精製する。次いで、精製した抗体を精製AT又はヒト血漿と共にインキュベートし、その後、ATの機能的活性を後述の発色アッセイで測定する。40

【0076】

RSL挿入の干渉とは異なるメカニズムを介してATを阻害する抗体又はその断片も本発明の範囲内にあるものとする。これらの抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、脱免疫モノクローナル抗体、ラクダなどの他の動物種由来の抗体、若しくは合成抗体、又はその断片であり得る。本発明の範囲内にある抗体又は抗体断片の主要な特徴は、ATに結合し、ATの機能的活性を阻害することである。これらの抗体は、ATにおける機能的に重要な部位の1つ又は複数を遮断し、その結果、ATの機能的活性を低下させる。

【0077】

ATを阻害する抗体は、一般に、機能的ATを用いて動物を免疫することによって得ることができる。次いで、抗体(血漿の回収及びAT-抗体の精製によるポリクローナル抗50

体、又は天然の A T を抗原として用いるハイブリドーマ技術を介して作製したモノクローナル抗体)を、A T を抗原として使用するアッセイを用いてスクリーニングする。すべての陽性抗体を、精製 A T と共にインキュベートすることによって A T に対する阻害活性について試験し、A T の機能的活性を、後述の発色アッセイを用いて試験する。あるいは、抗体を血漿に添加して、その血漿を凝固アッセイ(例えば、プロトロンビン時間(P T)、活性化プロトロンボプラスチン時間(a P T T))で試験することによってスクリーニングすることもできる。さらに、抗体を正常なヒト血漿に添加して、その後、A T の機能的活性を後述の発色アッセイで測定してもよい。これらのアッセイでは、抗体による阻害により A T の機能的活性が低下する。

【0078】

10

さらに、A T に結合し、A T のクリアランスの増強によって生体内の A T 減少を引き起こすか、又は他のメカニズムによって生体内の A T 活性を低下させる抗体又はその断片も本発明の範囲内にあるものとする。

【0079】

他の A T 阻害物質：

A T に結合し、中央のシートへの R S L の挿入の干渉とは異なるメカニズムによって A T を阻害するペプチド、抗体及び他の分子も本発明の範囲内にある。例えば、これらのペプチド又は化合物(例えばアプタマー)は、A T 上の他の機能的部位、例えば、標的プロテアーゼとの相互作用に関与する部位に結合してもよい。A T の機能的活性を好ましくは生体内で阻害することができるいかなる分子も本発明の範囲内にあるものとする。同様に、A T の機能的活性を好ましくは生体内で低下させることができいかなる分子も本発明の範囲内にあるものとする。

20

【0080】

A T の阻害を評価するための機能的 A T レベルの決定：

血漿中の A T 阻害物質の効果は、血漿又は他の(生体)液中の A T の機能的活性を測定するアッセイを用いて評価することができる。A T の機能的活性は、トロンビンに対する阻害活性に基づいて評価することができる。そのようなアッセイは商業的に利用可能である(f / e Actichrome AT III, American Diagnostics, Greenwich, CT, USA; STA Stachrome, Diagnostics Stago Inc, Parsippany, NJ, USA)。これらのアッセイの基礎は、トロンビンが適切な発色基質を変換し得ることにある(f / e S - 2238, Haemochrom Diagnostics, Molndal, Sweden)。発色基質は、色が生成する条件下でタンパク質分解酵素と反応するペプチドである。それらはいくつかの企業で合成的に製造されており、酵素に対して天然の基質の選択性に類似した選択性を保有するように設計されている。発色基質のペプチド部分に結合しているのは化学基 p - ニトロアニリドであり、酵素による切断後に放出されて、黄色を生じさせる。色の変化は分光測定法で追跡することができ、タンパク質分解活性に比例している。A T 測定の場合、ステップ1において、所与の量のトロンビンを血漿とインキュベートし、このステップ中に、機能性 A T がトロンビンの一部に結合してこれを不活性化する。次いで、アッセイのステップ2において、残存トロンビン活性を、発色基質を用いて測定する。残存トロンビン活性は A T 濃度に反比例する。最適な定量を確実に行うために、トロンビンの血漿とのインキュベーションは、A T の活性を最適化するヘパリンの存在下で行う。さらに、ウシトロンビンを、アッセイの特異性をさらに高めるために使用することが多い。この理由は、ウシトロンビンは、ヒトトロンビンと対照的に、別の血漿阻害物質であるヘパリン補因子IIとほとんど反応しないためである。また、発色基質と組み合わせたヒト又はウシ F X a を A T 活性レベルの測定に使用することもできる。

30

【0081】

40

この発色アッセイを用いて、A T 阻害物質による A T 阻害のレベルをインビトロ及びインビトロの両方で容易に測定することができる。インビトロでは、一定量(例えば X m l)の血漿を、例えば 0 . 1 X m l の食塩水又は緩衝液に溶解した一定量の A T 阻害物質と

50

共にインキュベートすることによって達成される。この混合物を 37 度でインキュベートし、その後、混合物中の A T 活性を、上述のような A T についての発色アッセイで測定する。次いで、得られた値を、血漿に代えてトロンビンと食塩水を含むサンプルで得られた値（機能性 A T の 100% 阻害に等しい）、並びに A T 阻害物質が加えられていない血漿を用いたサンプルで得られた値（0% 阻害と等しい。）と比較する。次いで、A T 阻害物質と共にインキュベートした血漿サンプル中の A T 阻害量を 0% 及び 100% 阻害対照と比較して A T の阻害%で表す。A T 阻害物質と共にインキュベートされる血漿サンプルは、正常血漿、又は出血患者若しくは出血のリスクのある患者（例えば血友病患者）由来の血漿であり得る。患者に投与された A T 阻害物質による A T の生体内での阻害は、A T 阻害物質を投与した際の循環 A T レベルを、この段落に記載の発色アッセイを用いて測定することによって評価することができる。

【 0082 】

本発明の臨床応用：

A T 阻害物質は出血性障害の予防的又はオンデマンド療法のために適用され得る。すなわち、一実施形態において、本発明は、出血性障害（凝固性低下）に罹患している対象の出血を治療又は予防するために使用する A T 阻害物質に関する。出血性障害は後天性又は遺伝性の出血性障害であり得る。好ましい実施形態において、出血性障害は血友病（例えば、血友病 A 又は B）である。より好ましくは、A T 阻害物質は、第 V I I I 因子又は第 I X 因子に対する中和抗体と共に血友病対象の処置に使用される。そのような場合において、阻害物質は、好ましくは予防的な第 V I I I 因子又は第 I X 因子バイパス療法として使用される。

【 0083 】

本発明の 1 つの適用は、阻害物質（I X の F V I I I に対する中和抗体）を用いて血友病患者の緊急又は予防的処置を行うことである。血友病における出血症状の重症度は概して凝固因子のレベルと相関する。重度の血友病患者は、F V I I I が無視できる量（正常レベルの < 1%）しかなく、多くの部位で自発的に出血する場合がある。しかし、最も頻度の高い部位は関節（70% ~ 80%）（特に膝及び肘）、及び筋肉 / 軟組織（10% ~ 20%）である。他に大量出血（5% ~ 10%）、ときには中枢神経系の出血（< 5%）も生じる。さらに、血友病患者では、手術又はその他の外傷後に過度の出血が生じ得る。血友病における凝固因子の予防的な補充は、欠乏因子の循環レベルを常時 1% 超に維持して関節及び軟組織における自発的出血を予防することを目的とするが、オンデマンド療法とは対照的に血友病性関節症を大きく予防する（M J Manc o - Johnson et al . , N Engl J Med 2007 ; 357 : 535 - 44）。特に、F V I I I が非常に少ないか全くない患者は、外因性の F V I I I で処置された場合、自身の免疫系が、投与された F V I I I を外来抗原とみなして寛容しないため、中和抗体が発生するリスクがある。実際に、重度の血友病患者の 20 ~ 30% にそのような中和抗体が発生しており（J Goudemand et al . , Blood 2006 ; 107 : 46 - 51 ; SC Gouw et al . , Blood 2007 ; 109 : 4693 - 4697）、このような中和抗体は、投与された F V I I I の効力を阻害することから F V I I I 阻害物質としばしば称される。現在のところ、血友病患者に適用し得る唯一の予防的治療法は欠乏因子の補充療法である。しかし、F V I I I に対する阻害物質を有する患者の場合には、投与された F V I I I が阻害物質により中和されるか、抗体が F V I I I に結合することによって循環血液から急速に取り除かれるため、予防的療法は事実上成り立たない。本発明によれば、これらの患者の血液凝固におけるフィブリン形成の欠陥を、循環 A T の機能的活性を低下させる A T 阻害物質の一定量を投与し、第 X a 因子の阻害の減少及びトロンビン活性の延長によりフィブリン形成を増加させることによって回復させることができる。要求される A T 阻害の程度は、A T 阻害物質を血友病患者に投与した際の機能的 A T の生体内レベルを測定することによってモニターすることができる。一方、効果的な止血のために要求される阻害の程度は、種々の量の A T 阻害物質の存在下で血友病血漿中の低濃度 T F によってトロンビン生成を誘導するインピトロの実験に基

10

20

30

40

50

づいて推定することができる。

【0084】

別の実施形態において、本発明は、過度の出血により特徴づけられる臨床状態の予防又は治療に使用するためのAT阻害物質に関する。過度の出血により特徴づけられる臨床状態は、例えば、手術、外傷及び内出血のうちの1つ又は複数であり得る。すなわち、本発明はさらに、外傷のある患者又は戦争犠牲者における失血を低減又は予防するための方法であって、AT阻害物質を患者に投与することを含む方法を提供する。本発明はまた、手術（例えば、冠状動脈バイパス又は他の血管系手術）を受けている患者における失血を低減又は予防するための方法であって、AT阻害物質を患者に投与することを含む方法を提供する。本発明はさらに、脳内出血が生じている患者における脳損傷を低減又は予防するための方法であって、AT阻害物質を患者に投与することを含む方法を提供する。また本発明は、内出血（例えば、食道静脈瘤からの出血、非ステロイド抗炎症剤の使用による出血）を有する患者における失血を低減又は予防するための方法であって、AT阻害物質を患者に投与することを含む方法を提供する。また、本発明は、抗凝固剤の使用により出血している患者の失血を低減又は予防するための方法を提供する。本発明は、手術、外傷、過度の出血が生じる他の状態（例えば、抗凝固剤の使用）において、また、内出血（例えば、脳出血、胃腸出血（例えば、食道静脈瘤からの出血））の場合において適用し得る。また、本発明により開示される方法は、出血のリスクのある患者の出血を予防するために使用可能であり、例えば、血友病患者において、血友病患者の関節、筋肉及び／又は軟組織における出血を予防するために使用可能である。10 20

【0085】

本発明に従って、後天性又は遺伝性の出血性障害（凝固性低下）を有する対象又は過度の出血により特徴づけられる臨床状態を有する対象における出血の治療及び予防に使用する場合、アンチトロンビンIIIの阻害物質は、ATの活性を、正常なATレベルの少なくとも90、80、50、20、10、5、1、0.5、0.2、0.1%に低下させる用量（ここで、正常なATレベルは上述の通りである。）で使用することが好ましい。

【0086】

生体内で使用するAT阻害物質の用量の手引きとなる機能的なATレベルの評価：

血漿中のAT阻害物質の効果は、上述の血漿中のATの機能的活性を測定するアッセイを用いて評価することができる。生体内で達成されるべきAT阻害のレベルは、出血性障害を有する患者由来の血漿サンプルを用いてインピトロで評価し得る。血友病血漿の場合、種々の濃度のAT阻害物質で補充した血漿はFVIII - 免疫枯渇血漿（Dade Behring, Marburg, Germany）又は血友病患者由来の血漿であり得る。次いで、これらの血漿サンプル中のトロンビン形成がTFの添加により開始される（例えば、Innovin, Dade Behring, B4212-50）。TF濃度をまず選択して、このFVIII枯渇血漿又は血友病血漿中でFVIII依存性トロンビン生成又はフィブリン形成を生じさせる。これは、正常レベルの0.1%（0.001U/ml）～25%（0.25U/ml）の範囲の種々の濃度のFVIII（重度～軽度の血友病状態を模倣する。）の存在下で、血漿サンプルを1:1000～1:80000希釈のInnovinとインキュベートすることによって達成される。フィブリン生成は、SpectraMaxマイクロタイタープレートリーダー及びSoftmax proソフトウェアの使用により適時に測定することができる。あるいは、トロンビン生成は、色素形成又は蛍光形成基質（f/e、DiaPharmaより提供されるTechnothrombin TGA system）を用いて評価される。次いで、この系においてFVIII用量依存性トロンビン - 又はフィブリン生成を誘導するTF濃度を選択する。30 40

【0087】

フィブリン形成又はトロンビン生成へのAT阻害物質の効果を評価するために、血友病患者由来又はFVIII欠乏血漿サンプルを種々の量のAT阻害物質とインキュベートして、（上記の手順で評価される）機能的ATレベルを20、40、60、80又は100%低下させる。コントロールとして、血漿サンプルに、種々の濃度のFVIII（f/e50

Baxter {リコンビネート [Recombinate] (登録商標)} 又は Bayeर {コゲネート [Kogenate] (登録商標)} の組換え FVIII を補充する。混合後、サンプルを、FVIII 依存性トロンбин生成及びフィブリン形成を生ずるよう (前述のように) 選択した濃度で TF を添加した際のフィブリン生成又はトロンбин 生成について評価する。次いで、このトロンбин生成及び / 又はフィブリン形成を上述のように測定する。機能性 AT レベルの低下 (AT 阻害の増加) した血漿サンプルで観察される増強した (促進された) フィブリン生成及び / 又はトロンбин 生成を、FVIII を用いて得られた結果と比較することができる。FVIII の不足を補う AT 阻害の所望のレベルは、中等度の血友病、軽度の血友病、又は血友病でない状態を模倣するように選択することができる。次いで、血漿中で達成すべき AT 阻害物質の対応レベルを計算することができる。

10

【0088】

AT 阻害物質と FVIIIとの同時投与も考慮することができる。そのような同時投与は FVIII の必要性を低下させ、免疫原性の危険及び阻害物質発生の機会を減少させることができる。患者において、第VII因子の投与は、十分に低いレベル、例えば患者に FVIII に対する免疫応答が発生しない程度に十分低いレベルに低減することができる。例えば、血友病患者に、0.001 ~ 0.05 U/ml (例えば 0.01 U/ml) の血漿濃度を達成させる FVIII の量を投与することができ、同時に、本発明に従って AT 阻害物質を用いて患者を処置することもできる。

20

【0089】

血友病だけでなく他の多くの医学的障害においても、従来の治療法を損なわせる出血がごく普通に生じ得る。現在のところ、適応外使用での rFVIIa がこれらの状態の唯一の治療法である。これらの状態としては、頭蓋内出血、肝臓病、手術 (例えば、心肺バイパス手術、脊柱手術、前立腺手術、同所性肝移植) の後の出血、外傷に関連した出血、抗血液凝固剤 (例えばワルファリン) の使用に関連した出血、及び他のものが挙げられる。

【0090】

脳内出血は、卒中の最も障害性の高い形態の一つである。この障害を有する患者の 3 分の 1 以上が発病後 1 か月以内に死亡し、大多数が重度に衰弱し、機能的な独立を回復するのは 20 %のみである。現在、脳内出血に対する有効な治療法はないが、組換え FVIIa の投与による血液凝固の刺激が有望な結果を示している (SA Mayer et al., N. Engl. J. Med. 2005; 352: 777 - 85)。血腫の体積は、脳内出血後の死亡率及び機能的帰結の重大な決定要素であり、初期の血腫の成長は神経学的悪化の重要な原因である。rFVIIa によりこの体積の増加が縮小されることが示された。フェーズ 3 試験において、梗塞のサイズに対する rFVIIa の好ましい効果が再び示され、臨床的には、rFVIIa は血腫の成長を縮小させたが、脳内出血後の生存率又は機能的帰結は改善しなかった (SA Mayer et al., N. Engl. J. Med. 2008; 358: 2127 - 37)。

30

【0091】

アルコール性若しくは肝炎後肝硬変又は他の疾患による肝臓病を有する患者は、凝固因子の循環レベルの低下をもたらす肝臓による凝固因子の合成低下、並びに食道及び胃の静脈瘤の存在による重度の出血が生じるリスクがある。これらの患者は、現在、凝固因子濃縮物又は rFVIIa の注入により処置されている。重度の出血は、種々の凝固因子の循環レベルの低下により、肝移植、及び非硬変患者の部分的肝切除の間に生じる場合もある。過度の出血は、心臓手術を受けている患者にも生じ得る。この出血リスクの増加は、体外酸素供給器用のプライミング流体の使用の結果としての血液希釈、抗血液凝固剤の使用、及び代用血管の機械的な問題による凝固因子の血漿レベルの低下によるものである。

40

【0092】

抗血液凝固剤は、心房細動、深部静脈血栓症、心筋梗塞及び他のものを含む多くの血栓 - 塞栓疾患に使用されている。経口の抗血液凝固剤で処置された患者は、機能的なビタミン K 依存性血液凝固タンパク質のレベルが低下し、出血性合併症のリスクがある。出血の

50

発生率は、治療の国際標準比（INR）で1か月当たり約0.6～0.7%であり、大量出血イベントの発生率も相當にある。したがって、抗ビタミンK効果を逆行させる能力が重要となる。緊急の場合、血漿又はプロトロンビンの複合濃縮物、及び組換えFVIIaが使用される。代替手段として本発明を使用することができる。本発明の利点は、AT阻害物質を受けている患者の機能的ATレベルを測定することによって血液凝固促進効果を決定できるということである。

【0093】

前述の臨床状態において、並びに出血リスクの増加又は進行中の出血がある他の疾患において出血を予防又は阻止することが医学的に必要である。出血を止めるには、組換えFVIIa又は血漿由来活性化プロトロンビン複合体（例えばFEIBA）が唯一利用可能である（J. Astermark et al., Blood 2007; 109: 546-551; HR Roberts et al., Blood 2004; 104: 3858-3864）。これらのいずれも出血の予防には使用できない。さらに、これらの薬剤の効力又は副作用を予測する良好なインピトロアッセイがない。本発明は、処置の効果が測定及びモニター可能であり、また、予防的にだけでなくオンデマンド療法にも使用し得る点で、上記血液凝固促進剤に対する選択肢を提供するものである。本発明は、AT阻害物質を、出血のリスクのある患者又は出血している患者に投与することで構成される。投与されるAT阻害物質の量の薬理学的制御は、機能的ATの血漿レベルを測定することによって達成し得る。

【0094】

トロンビン形成を促進するAT阻害物質の有効濃度の評価：

上述のように、生体内でのAT阻害の標的レベルは、出血性障害を有する患者由来の血漿サンプルを用いてインピトロで評価し得る。血液凝固を導くTFの添加の際、フィブリン生成は、SpectraMaxマイクロタイプレートリーダー及びSoftmax proソフトウェアの使用によって適時に測定することができ、トロンビン生成は発色基質又は蛍光発生基質（f/e DiaPharma製のTechnothrombin TGA system）を用いて評価することができる。

【0095】

種々の量のAT阻害物質を含む患者由来の血漿サンプルにおけるトロンビン生成及びフィブリン形成の結果を、正常な対照由来の血漿サンプルで得られた結果と比較する。次いで、正常対照由来の血漿サンプルで観察される範囲にトロンビン生成及びフィブリン形成を回復させることのできるAT阻害物質の量、並びに生物学的利用能及び薬物動態特性に基づいて、投与すべきAT阻害物質の量を計算する。投与すべき用量は、上述のアッセイを用いて、患者にAT阻害物質を投与する際の循環AT活性レベルを測定することによって確認する。

【0096】

AT阻害物質の医薬組成物：

ヒトへの投与について、本発明は、AT阻害物質と、薬学的に許容される担体若しくは賦形剤と、を含む医薬組成物を使用し得る。本発明において、「薬学的に許容される」とは、担体又は賦形剤が、利用される用量及び濃度で、それらが投与される患者に何ら不要又は有害な効果を引き起こさないことを意味する。そのような薬学的に許容される担体及び賦形剤は当分野で周知である（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; 及びHandbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000] 参照）。本発明のAT阻害物質は、滅菌溶液として製剤化及び投与されることが好まし

10

20

30

40

50

いが、凍結乾燥調製物を利用することも本発明の範囲内にある。滅菌溶液は、滅菌濾過、又は当技術分野で公知の他の方法によって調製される。次いで、溶液を凍結乾燥し、薬学的投与容器に充填する。溶液のpHは、概してpH3.0~9.5、例えばpH5.0~7.5である。タンパク質又はペプチドは、典型的には、適切な薬学的に許容される緩衝液を有する溶液に含有され、また、タンパク質の溶液は塩を含んでもよい。ある実施形態では洗浄剤が添加される。本発明で使用するために、AT阻害物質は注射用製剤に製剤化してもよい。非経口製剤は、本発明での使用に適しており、好ましくは静脈投与のために適している。これらの製剤は、治療有効量のAT阻害物質を含有しており、滅菌液体溶液、液体懸濁液、又は凍結乾燥形態であり、任意選択で安定剤又は賦形剤を含有する。典型的には、凍結乾燥組成物は、適切な希釈液（例えば、注射用滅菌水、滅菌生理食塩水）で再構成される。

10

【0097】

AT阻害物質を用いた出血性障害を有する患者の処置：

AT阻害物質は、静脈注射により投与されてもよく、他の投与経路及び／又は部位に投与されてもよい。必要とされる用量は特に臨床状態に依存する。

【0098】

本発明者らは、血友病血漿におけるトロンビン及びフィブリリン生成に対するAT阻害の種々の程度の効果を、ある用量範囲のFVIIの効果と比較して評価する方法を上述した。AT阻害物質を用いる予防的処置の場合、先の「生体内で使用するAT阻害物質の用量の手引きとなる機能的なATレベルの評価」の項に記述される約0.3UのFVIIの補充に相当する阻害の程度と等価である、類似の程度のAT阻害が望ましい。AT阻害物質の薬物動態特性を考慮すると、インビトロの実験と同程度に生体内でのATの阻害を生じさせる用量を推定し得る。AT阻害物質投与後、患者における機能的ATレベルをモニターすることによって、AT阻害の所望のレベルが実際に患者で生じているかがチェックされる。

20

【0099】

急性出血エピソードの場合、AT阻害物質は、用量を少し増やし、出血が停止するまでATの機能的レベルの指標を得ながら投与してもよい。血友病以外の他の原因による出血エピソードを有する患者の治療も、同様の戦略を用いて行うことができる。出血が止まるまでAT阻害物質を投与してATの機能的レベルをゆっくり低下させる。AT阻害物質投与後の機能的ATレベルのモニタリングは上述のアッセイを用いて行う。

30

【0100】

化合物をAT阻害物質として同定する方法：

さらなる態様において、本発明は、化合物をAT阻害物質として同定する方法に関する。好ましくは、この方法は、(a)化合物を健常人由来のプール血漿に添加するステップと、(b)a)で得られた化合物含有プール血漿を単離トロンビン及び単離第Xa因子のうちの少なくとも1つと混合するステップと、(c)b)で得られた混合物中のトロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性を決定し、化合物を含む混合物中の活性を、化合物を含まない同じ血漿に混合されたトロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性と比較するステップであって、好ましくは、トロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性は、発色基質を用いるアッセイで測定される、ステップと、(d)血漿中のトロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性の低下を、化合物を含まない同じ血漿に比べて抑制する化合物を、ATの阻害物質として同定するステップであって、好ましくは、化合物はトロンビン及び第Xa因子のうちの少なくとも1つの活性の低下を50%を超えて阻害する、ステップと、を含む。この方法の好ましい実施形態において、化合物は、ステップ(a)の前に、ATに特異的に結合する化合物として選択される。この方法において、化合物は、ATに特異的に結合するように選択されたペプチド、アプタマー、抗体又は抗体断片であることが好ましく、より好ましくは、ペプチド、アプタマー、抗体又は抗体断片は、ATのRSL配列中のエピトープに特異的に結合するように選択されたものである。

40

50

【0101】

本明細書及び特許請求の範囲において、動詞“comprise”（「含む」）及びその変化形は、非限定的な意味でその動詞の後に続く項目を含むことを意味するために使用され、特に言及されていない項目を排除するものではない。さらに、不定冠詞“a”又は“an”による要素への言及は、文脈により明らかに要素が一つであること及び要素の一つだけであることが要求されない限り、複数の要素が存在する可能性を排除しない。したがって、不定冠詞“a”又は“an”は、通常「少なくとも一つ」を意味する。

【0102】

本明細書で引用されるすべての特許及び参考文献は、言及されることによりその全体が本明細書に組み入れられる。

10

【0103】

以下の実施例は例示目的でのみ提供され、いかなる様式でも本発明の範囲の限定を意図するものでない。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】単純化した血液凝固スキームを示す。活性化は、組織因子（TF）への血液の曝露に始まり、TFは血漿FVII（a）と複合体を形成する。TF/FVIIa複合体はFXを活性化してFXaとし、次いでFXaはFVと複合体を形成する。FXa/FVa複合体は、酵素前駆体プロトロンビンを、血液凝固の中心的酵素であるトロンビンに変換する。この経路は血液凝固の基礎経路と考えられる。この基礎経路は、2つの経路、すなわち1つはFIXとFVIIとで構成される経路、もう一つはFXIで構成される経路で増幅される。FIX/FVII経路はTF/FVIIa複合体により活性化され、TF/FVIIa複合体はFIXをFIXaに活性化する。FIXa/FVIIa複合体中のFIXaはタンパク質分解活性を有し、FXをFXaに活性化できる。別の増幅ループは、トロンビンによる活性化の際にFIXも活性化し得るFXIからなる。図には示されていないが、AT及びリン脂質補因子を含む種々の凝固阻害物質がある。

20

【図2】セルピンA1の構造（Protein Data Bank（PDB）code 1QLP；PR E11iott et al., Nat. Struct. Biol. 1996; 3: 676 - 681）を示す。反応中心ループ（RCL）は分子の頂部にある。点で描かれた矢印は、反応中心ループが挿入される中央のシートの「溝」を示す。

30

【図3】プロテアーゼを有するセルピンの阻害作用の構造的メカニズムを示す。示されている構造は、SERPINA1 Protein Data Bank（PDB）コード1QLPの構造である。経路b c：プロテアーゼ-セルピン相互作用は、プロテアーゼの活性部位セリンが、セルピンの反応部位ループ（=反応中心ループ，RCL）のP1残基に結合している安定な共有結合複合体をもたらす。結果として、プロテアーゼは、歪められた不活性な状態で分子の底部に掛かっている。経路b d：セルピン-プロテアーゼ複合体は、中央のシートへのRSLの挿入が完了する前に分離され、セリンプロテアーゼの活性部位の立体構造的变化が誘導される。結果として活性プロテアーゼが放出され、安定な立体構造を有する不活性なセルピンが残る。この状況において、セルピンはプロテアーゼの基質のように作用し、立体構造的なトラップを回避する。参考文献：PR E11iott et al., Nat. Struct. Biol. 1996; 3: 676 - 681; A Dementiev et al., J Biol Chem 2003; 278: 37881 - 37887; JA Huntington et al., Nature 2000; 407: 923 - 926; H Loebermann et al., J. Mol. Biol. 1984; 177: 531 - 557。

40

【図4】いくつかのAT阻害物質のメカニズムを描いた略画である。ATの中央のシートに挿入されるペプチド、又は中央のシートへのRSLの挿入を抑制するモノクローナル抗体（mAb）の効果が示されている。略画の左側の部分は通常の状況を示しており、RSLが標的プロテアーゼによって切断されると、切断されたRSL（残基P1 - P14）が中央のシートに挿入され、これによりプロテアーゼの活性部位の3D構造が歪めら

50

れ、プロテアーゼを不活性にする。右側では、RSLのP1-P14配列を模倣するペプチドが中央のシートに挿入され、これによりATのRSL挿入が抑制される。ATの代替的阻害物質として、RSLのP4-P14配列に結合するmAbは中央のシートへのRSLの挿入を抑制し、ATを標的プロテアーゼの基質にする。

【図5】ATに対するアフィニティ精製ヤギポリクローナル抗体（抗AT）が、トロンビンを用いて測定される新鮮なヒト血漿中のATの活性を完全に阻害することを示す。アフィニティ精製ヤギ抗AT抗体（25μl中、20μg）を、25μlの1：10希釈した新鮮なヒト血漿に添加し、15分間、室温でインキュベートした。次いで、50μlの混合物をトロンビン（50μl）と共にインキュベートし、残存するトロンビン活性を、50μlの発色基質エチル-マロニル-S-Pro-Arg-pNA・AcOH（2mg/ml）の溶液に添加して測定した。次いで、混合物を405nmで毎分測定した。OD値をY-軸に示し、時間（分単位）をX-軸に示した。種々の濃度の血漿を試験して用量応答曲線を作成した。100%血漿により、添加されたトロンビンの活性が強力に阻害されること、及びATに対する抗体の追加（100%血漿+抗AT）により、この血漿の効果が完全に阻害されることに留意されたい。10

【図6】ATに対するアフィニティ精製ヤギポリクローナル抗体（抗AT）が、ウシFXaを用いて測定される新鮮なヒト血漿中のATの活性を完全に阻害することを示す。アフィニティ精製ヤギ抗AT抗体（7.5μl中、6μg）を、7.5μlの1：5希釈した新鮮なヒト血漿に添加し、15分間、室温でインキュベートした。次いで、15μlのヘパリン（2.5U/ml）を添加し、混合物を30分間、37℃でインキュベートした。次いで、75μlの発色基質MAPA-Gly-Arg-pNA（8.4umol/ml）を添加し、混合物をさらに30分間インキュベートした。最後に、ウシFXa（75μl）を添加し、残余のFXa活性を405nmで毎分測定した。OD値をY-軸に示し、時間（分単位）をX-軸に示した。種々の濃度の血漿を試験して用量応答曲線を作成した。100%血漿により、添加されたFXaの活性が強力に阻害されること、及びATに対する抗体の追加（100%血漿+抗AT）により、用量依存的にこの血漿の効果が阻害されることに留意されたい。20

【図7】ATに対するアフィニティ精製ヤギポリクローナル抗体が新鮮なヒト血漿中のトロンビン生成を促進することを示す。精製ヤギ抗-アンチトロンビンIII抗体（a-AT）を新鮮なヒト血漿に添加した。次いで、混合物を組織因子と共にインキュベートして血液凝固系の活性化を誘導した。混合物中のトロンビン生成を、リアルタイムで発色基質を用いて測定し、標準物質を参照としてnMで表した。同量のTFの添加の際に生成されるトロンビンの量が2倍を超えて増加することに留意されたい。30

【図8】ATに対するアフィニティ精製ヤギポリクローナル抗体が、FVIIId欠乏血漿中のトロンビン生成を促進することを示す。精製ヤギ抗-アンチトロンビンIII抗体（抗AT）を血漿試料に添加した。次いで、混合物を組織因子と共にインキュベートして血液凝固系の活性化を誘導した。混合物中のトロンビンを、発色基質を用いて測定した。ATを完全に阻害（250μg/ml）した際にサンプル中で生成されるトロンビンの量が2倍を超えて増加することに留意されたい。40

【実施例】

【0105】

実施例1（ATに対するポリクローナル抗体を用いた血漿中のAT活性の阻害）：

抗体がヒト血漿中のAT活性を確かに阻害し得ることを示す例として、ポリクローナル抗体を、ヒトATで免疫したヤギの血清から精製した（Bioconnect, Huissen, the Netherlands；Catalog nr: AHP1750）。精製AT（Kybernin P, CSL-Behringwerke, Marburg, Germany；Catalog nr: 83167111A）を、製造者の指示に従ってCNBr-活性化セファロース4B（GE Healthcare Life Sciences, Diegem, Belgium）に結合させた（1グラムのCNBr活性化セファロースに対して約25mgのAT）。ビーズを洗浄し、次いで、リン酸緩衝生理50

食塩水 (pH 7.4) (PBS) で 1 : 2 希釀した 2.5 ml のヒト AT に対するヤギ抗血清と共に、室温で 2 時間インキュベートした。このビーズを再度洗浄した後、0.1 M のグリシン、0.15 NaCl (pH 2.5) で抽出した。ビーズを、1300 g で 1 分間、遠心分離によって沈降させ、上清を取り出し、直ちに 1 M トリス (pH 8.5) で中和し、PBS に対して透析した。得られた調製物を、純度について SDS-PAGE で分析し、非還元条件下では Mr が約 160000 の 1 つのバンドからなること、還元条件下では Mr が約 50000 と約 25000 の 2 つのバンドからなることが分かった。

【0106】

機能的 AT 活性に関する 2 つのアッセイを用いて、血漿中の機能的 AT に対する抗体の効果を評価した。最初のアッセイ (STA AT III kit, Catalog nr : 12145103140; Roche Diagnostics, Almere, the Netherlands) は、トロンピンを標的プロテアーゼとして使用する発色アッセイである。このアッセイの原理は、標準量のトロンピンをヘパリンの存在下で血漿に添加し、次いで、血漿について、発色基質エチル-マロニル-S-Pro-Arg-pNA . AcOH (2 mg/ml) を用いて残余のトロンピン活性を検査することである。このアッセイにおいて、50 μL の 1 : 20 希釀 (アッセイで提供される希釀液中) 血漿試料を試験する。血漿中の AT 機能に対する効果を評価するために、25 μL 中の 20 μg の精製抗 AT 抗体を 25 μL の 1 : 10 希釀正常血漿に添加した。次いで、混合物をアッセイにおいて試験した。結果は、トロンピン活性に対する血漿の阻害効果が、精製抗 AT 抗体の添加により中和されたことを明確に示した (図 5において、「100% 血漿」を「100% 血漿 + 抗 AT」及び「0% 血漿」と比較されたい)。
10

【0107】

AT は、血漿におけるトロンピンの主要な阻害物質であるが、血漿中の他の阻害物質 (例えばヘパリン補因子 II) もトロンピンの阻害に寄与し得る。対照的に、FXa は血漿中で AT により完全に阻害される。したがって、抗 AT 抗体を用いる結果を、別のアッセイ (STA Rotachrom Heparin, Catalog nr : 11556959140; Roche Diagnostics) で確認した。このアッセイは、ウシ FXa をプロテアーゼとして、また、エチル-マロニル-S-Pro-Arg-pNA . AcOH を発色基質 (2 mg/ml で) として使用したこと以外は、上述のトロンピンを用いたアッセイと同様である。さらに、15 μL の 1 : 10 希釀 (アッセイで提供される希釀液中) 血漿試料を試験する。6 μg のアフィニティ精製抗 AT 抗体 (7.5 μL 中) と 7.5 μL の 1 : 5 希釀正常血漿との混合物を作製し、アッセイで試験した。アフィニティ精製抗体を新鮮なヒト血漿へ添加すると、用量依存的に FXa に対する血漿の阻害効果が破棄された (図 6において、「100% 血漿」を「100% 血漿 + 抗 AT」及び「0% 血漿」と比較されたい)。
20
30

【0108】

図 5 及び図 6 に示される結果は、血漿における AT 活性の完全な阻害が、AT に対するポリクローナル抗体によって達成可能であることを示している。アフィニティ精製 AT 抗体の効果がいくつかの他の血漿サンプルでも確認された。試験したすべての血漿サンプルで、AT に対するアフィニティ精製ポリクローナル抗体の添加による AT 活性の完全な阻害が確認された。
40

【0109】

実施例 2 (正常及び FVII 欠乏血漿におけるトロンピン生成に対する AT 阻害物質の効果) :

次の実験のセットにおいて、アフィニティ精製抗 AT 抗体の追加による AT の阻害が、正常な血漿及び血友病血漿中の TF によって引き起こされるトロンピン生成に影響し得るかを確認した。

【0110】

トロンピンは血液凝固系の重要な酵素であり、インピトロで血漿に TF を添加すると適時にトロンピンが生成されることは、血液凝固に関する優れた生体外モデルと考えられる
50

。血友病血漿における低TF濃度でのトロンビン生成は著しく低下している。血友病患者の出血を止めるために効果があることが示されている治療的介在物、すなわちFVIII調製物、rFVIIa、及び活性化プロトロンビン複合体（例えばFEIBA）（J. A. stermark et al., Blood 2007; 109: 546 - 551; H.R. Roberts et al., Blood 2004; 104: 3858 - 3864）はすべて、トロンビン生成をある程度回復させることが示されている（K. Varadi et al., J. Thromb. Haemost. 2003; 1: 2374 - 80; N.M. Aljamali et al., Haemophilia 2009; 15: 1318 - 26）。そこで、本発明者らは、AT阻害物質の効果を評価するためにこの生体外モデルを選択した。

10

【0111】

モデルとなる較正済み自動化トロンボグラム（thrombogram）アッセイは、実質的に、Hemkerら（Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2002; 32: 249 - 2）、及びThrombinoscope（Maastricht, the Netherlands）により提供されるマニュアルに記載されているように行った。血液凝固は、1又は5pMの組換えヒト組織因子、4μMの凝血原リン脂質、及び417μMの蛍光発生基質Z-Gly-Gly-Arg-AMCの存在下でのカルシウム再沈着により開始させた。蛍光を、フルオロメータ（Fluoroscan Ascent, ThermoLabsystems, Helsinki, Finland）を用いてモニターし、内因性トロンビン電位（ETP）を、トロンビノスコープ（Thrombinoscope）（登録商標）ソフトウェア（Thrombinoscope）を用いて計算した。血小板が不十分又は豊富な血漿中で得られた「トロンボグラム」は、凝固性低下（例えば、血友病、抗血液凝固剤の使用）だけでなく凝固亢進（例えばAT欠乏）の尺度ともなる。図7に示されるように、精製抗AT抗体の添加は、凝固亢進状態の存在と一致する正常血漿中のトロンビン生成の増加を誘導し、このことは、血漿中でATが阻害されることと合致する。

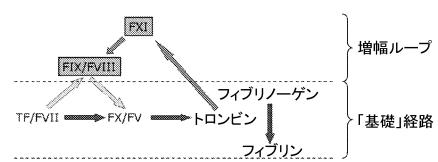
20

【0112】

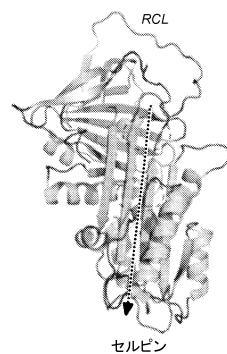
正常プール血漿に代えてFVIII欠乏血漿を使用すること以外は同様の実験を行った。血友病患者は、第VIII因子（又は第IX因子）が欠乏しており、低TF濃度でのトロンビン生成が健常者よりもかなり低いことを示している。図8から分かるように、トロンビン生成は、予想されたように血友病血漿において実際に低下しており、ピークレベルは約20nMであって、血漿の凝固性低下と合致する。ATに対するアフィニティ精製ヤギポリクローナル抗体の添加は、用量依存的にFVIII欠乏血漿におけるトロンビン生成を促進した。最も高い濃度（250μg/ml）で添加した場合にほぼ2倍のトロンビン生成の増加が観察された。血漿中のトロンビン生成は生体内でのトロンビン生成能力の優れた指標と考えられ、これらのデータは、ATの阻害が、FVIIIをバイパスすることによってトロンビン生成低下を回復させる、血友病に対する治療的アプローチを構成するものであることを強く支持している。

30

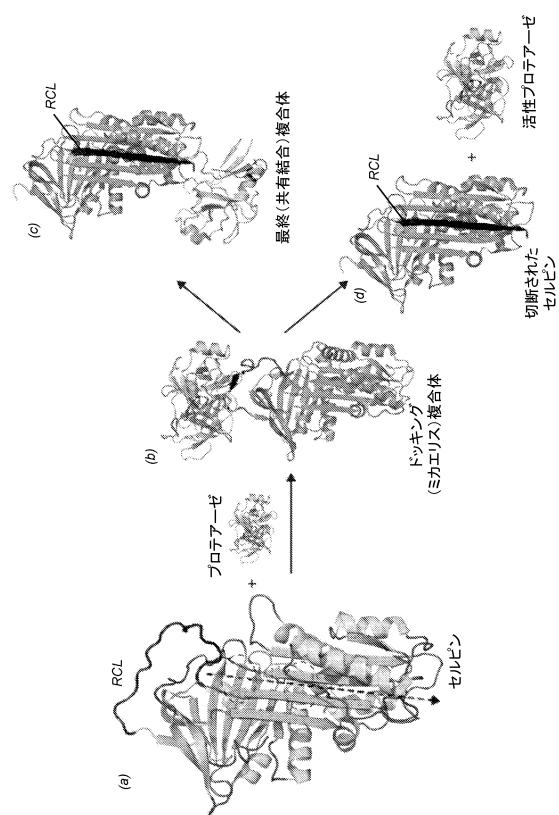
【図1】



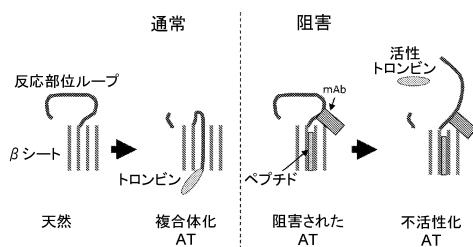
【図2】



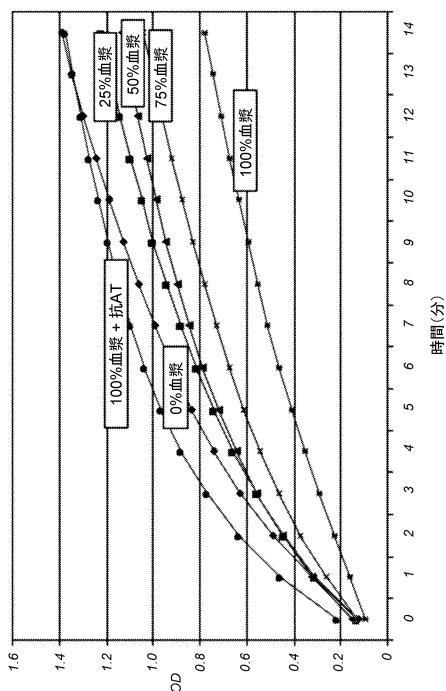
【図3】



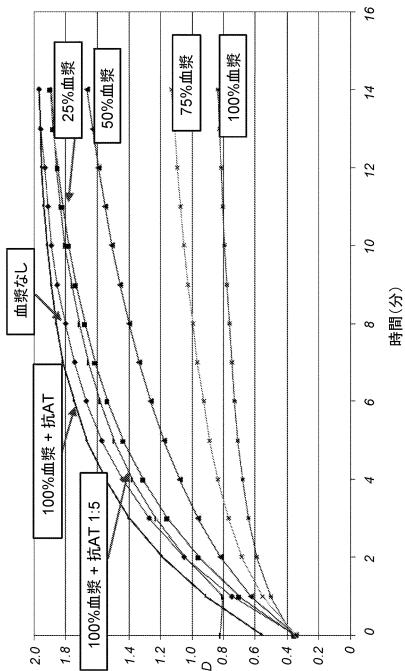
【図4】



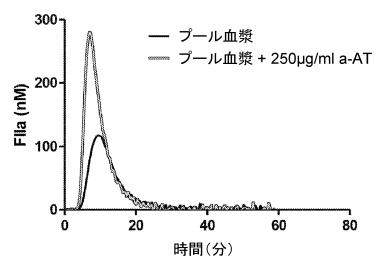
【図5】



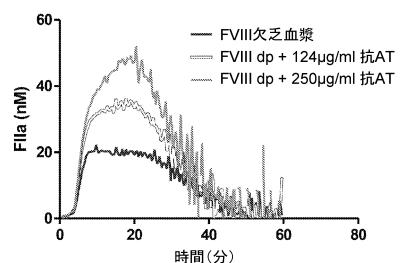
【図6】



【図7】



【図8】



【配列表】

0006198277000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 07 K 7/08 (2006.01) C 07 K 7/08
C 07 K 16/18 (2006.01) C 07 K 16/18

(72)発明者 ハック , コルネリス エリック
オランダ , エヌエル 1111 ピーブイ ディーメン , パウルス エムティンクヴェーク
40
(72)発明者 イルディス , カフェル
オランダ , エヌエル 6846 エルティー アルンヘム , スケエプヴァールト 45

審査官 茅根 文子

(56)参考文献 特表2010-533684 (JP, A)
Treatment of Hemophilia , 2004年 , No. 34 , pp. 1-22
Br. J. Haematol. , 2007年 , Vol. 138 , pp. 305-315
Blood , 2009年 , Vol. 113 No. 1 , pp. 11-17
BJOERK INGEMAR , JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , 1992年 , V267 N3 , P1976-1982
Eur. J. Biochem. , 1989年 , Vol. 180 , pp. 319-326
J. Biol. Chem. , 1989年 , Vol. 264 No. 23 , pp. 13736-13739
J. Biol. Chem. , 1990年 , Vol. 265 No. 9 , pp. 5135-5138
Eur. J. Pharmacol. , 2000年 , Vol. 391 , pp. 1-9

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 61 K 38 / 00 - 38 / 58
A 61 K 41 / 00 - 45 / 08 ; 48 / 00
A 61 K 39 / 39 5
A 61 P 7 / 04
G 01 N 33 / 52
C 07 K 7 / 08
C 07 K 16 / 18
G 01 N 21 / 78
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / WPI DS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)