

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-510513

(P2005-510513A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 38/22

A 6 1 K 38/43

A 6 1 P 7/04

F I

A 6 1 K 37/24

A 6 1 P 7/04

A 6 1 K 37/465

テーマコード (参考)

4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2003-541870 (P2003-541870)  
 (86) (22) 出願日 平成14年11月5日 (2002. 11. 5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年5月7日 (2004. 5. 7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2002/000734  
 (87) 国際公開番号 W02003/039579  
 (87) 国際公開日 平成15年5月15日 (2003. 5. 15)  
 (31) 優先権主張番号 PA 2001 01664  
 (32) 優先日 平成13年11月9日 (2001. 11. 9)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 501497563  
 ノボ ノルディスク ヘルス ケア アク  
 チェンゲゼルシャフト  
 スイス国, ツェーハー-8050 チュー  
 リッヒ, アンドレアシュトラーセ 15  
 (74) 代理人 100058479  
 弁理士 鈴江 武彦  
 (74) 代理人 100091351  
 弁理士 河野 哲  
 (74) 代理人 100088683  
 弁理士 中村 誠  
 (74) 代理人 100084618  
 弁理士 村松 貞男  
 (74) 代理人 100092196  
 弁理士 橋本 良郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VII因子ポリペプチドおよびTAFIポリペプチドを含む薬学的組成物

## (57) 【要約】

本発明は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドプロテインC阻害剤を含む薬学的組成物、並びに出血の発症を治療するためのこれらの使用に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む薬学的組成物。

**【請求項 2】**

前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチドが、VII因子関連ポリペプチドである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記VII因子関連ポリペプチドが、VII因子アミノ酸配列変異体である、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

請求項 2 または請求項 3 に記載の組成物であって、前記VII因子関連ポリペプチドの活性と天然のヒトVIIa因子（野生型FVIIa）の活性との間の比は、本明細書に記載されたとおりの「インビトロ加水分解アッセイ法」で試験したときに、少なくとも約1.25である組成物。

**【請求項 5】**

前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチドが、VII因子である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記VII因子が、ヒトVII因子である、請求項 5 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記VII因子が、組換えヒト因子VIIである、請求項 6 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチドが、その活性型である、請求項 1～7のいずれか1項に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記VII因子が、組換えヒトVIIa因子である、請求項 8 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドが、TAFI関連ポリペプチドである、請求項 1～9のいずれか1項に記載の組成物。

**【請求項 11】**

前記TAFI関連ポリペプチドが、TAFIアミノ酸配列変異体である、請求項 10 に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記TAFI関連ポリペプチドの活性と天然のヒト血漿TAFI（野生型TAFI）の活性との間の比は、本明細書に記載したとおりの「TAFIアッセイ法」で試験したときに、少なくとも約1.25である、請求項 10 または請求項 11 に記載の組成物。

**【請求項 13】**

前記TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドが、TAFIポリペプチドである、請求項 1～9のいずれか1項に記載の組成物。

**【請求項 14】**

前記TAFIが、ヒトTAFI15である、請求項 13 に記載の組成物。

**【請求項 15】**

前記TAFIが、組換えヒトTAFIである、請求項 14 に記載の組成物。

**【請求項 16】**

前記TAFIが、活性化されたTAFIである、請求項 15 に記載の組成物。

**【請求項 17】**

請求項 1～16のいずれか1項に記載の組成物であって、前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、および前記TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、約100：1および約1：100（w/wVII因子：TAFI）の間の質量比で存在する組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 18】

組成物は、注射または輸液、特に注射のために適切な薬剂的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項 19】

出血の発症の治療を含むパーツのキットであって、

f) VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、および薬学的に許容されるキャリアの第1の単位剤形の標品の有効な量；

g) TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドおよび薬学的に許容されるキャリアの第2の単位剤形の標品の有効な量；および

h) 前記第1および第2の剤形を含むための容器手段、  
を含むパーツのキット。

10

## 【請求項 20】

前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチドが、VII因子関連ポリペプチドである、請求項19に記載のキット。

## 【請求項 21】

前記VII因子関連ポリペプチドが、VII因子アミノ酸配列変異体である、請求項20に記載のキット。

## 【請求項 22】

請求項20または請求項21に記載のキットであって、前記VII因子関連ポリペプチドの活性と天然のヒトVIIa因子（野生型FVIIa）の活性との間の比は、本明細書に記載されたとおりの「インビトロ加水分解アッセイ法」で試験したときに、少なくとも約1.25であるキット。

20

## 【請求項 23】

前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチドが、VII因子である、請求項19に記載のキット。

## 【請求項 24】

前記VII因子が、ヒトVII因子である、請求項23に記載のキット。

## 【請求項 25】

前記VII因子ポリペプチドが、組換えヒト因子VIIである、請求項24に記載のキット。

## 【請求項 26】

前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチドが、その活性型である、請求項19～25のいずれか1項に記載のキット。

30

## 【請求項 27】

前記VII因子が、組換えヒトVIIa因子である、請求項26に記載のキット。

## 【請求項 28】

前記TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドが、TAFI関連ポリペプチドである、請求項19～27のいずれか1項に記載のキット。

## 【請求項 29】

前記TAFI関連ポリペプチドが、TAFIアミノ酸配列変異体である、請求項28に記載のキット。

40

## 【請求項 30】

前記TAFI関連ポリペプチドの活性と天然のヒト血漿TAFI（野生型TAFI）の活性との間の比は、本明細書に記載したとおりの「TAFIアッセイ法」で試験したときに、少なくとも約1.25である、請求項28または請求項29に記載のキット。

## 【請求項 31】

前記TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドが、TAFIである、請求項19～27のいずれか1項に記載のキット。

## 【請求項 32】

前記TAFIが、ヒトTAFI33である、請求項31に記載のキット。

## 【請求項 33】

50

前記TAFIが、組換えヒトTAFIである、請求項32に記載のキット。

【請求項34】

前記TAFIが、活性化されたTAFIである、請求項33に記載のキット。

【請求項35】

請求項19～34のいずれか1項に記載のキットであって、前記VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、および前記TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、約100：1および約1：100（w/wVII因子：TAFI）の間の質量比で存在するキット。

【請求項36】

出血の発症を治療するための薬物の製造のための、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドと組み合わせたVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの使用。

10

【請求項37】

出血の発症を治療するための薬物の製造のための、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項38】

前記薬物が、凝固時間を減少するためのものである、請求項36または請求項37に記載の使用。

【請求項39】

前記薬物が、血餅溶解時間を延長するためのものである、請求項36または請求項37に記載の使用。

【請求項40】

前記薬物が、血餅強度を増大するためのものである、請求項36または請求項37に記載の使用。

20

【請求項41】

前記薬物が、注射または注入、特に注射のために処方される、請求項36～40のいずれか1項に記載の使用。

【請求項42】

前記出血の発症が、外傷、または手術、または血小板の計数もしくは活性の低下による、請求項36～41のいずれか1項に記載の使用。

【請求項43】

前記薬物が、単一剤形である、請求項36～42のいずれか1項に記載の使用。

30

【請求項44】

前記薬物が、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を含む第1の単位剤形およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む第2の単位剤形の形態で調製される、請求項36～42のいずれか1項に記載の使用。

【請求項45】

被検者における出血の発症を治療するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に出血を治療するために有効である方法。

【請求項46】

被検者における凝固時間を減少するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に凝固時間を減少するために有効である方法。

40

【請求項47】

被検者における止血を増強する方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に止血を増強するために有効である方法。

【請求項48】

50

被検者における血餅溶解時間を延長するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に血餅溶解時間を延長するために有効である方法。

【請求項49】

被検者における血餅強度を増大するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に血餅強度を増大するために有効である方法。

【請求項50】

VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドが、単一の剤形で投与される、請求項45～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

請求項45～49のいずれか1項に記載の方法であって、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を含む第1の単位剤形およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む第2の単位剤形の形態で投与される方法。

【請求項52】

前記第1の単位剤形および前記第2の単位剤形が、15分を超えて時間を離して投与されない、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

出血の発症のための治療剤を含むキットであって、  
 a) VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの有効な量、並びにTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドおよび薬剤的に許容されるキャリアの単一の単位剤形の有効な量；および、  
 b) 前記単一の単位剤形を含むための容器手段、  
 を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

本発明は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドおよびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む薬学的組成物に関する。また、本発明は、出血の発症を被っている被検者を治療するため、またはこれを予防するための薬物の製造のための、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドおよびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせの使用に関する。また、本発明は、被検者における出血の発症を治療するための方法に、および被検者における血餅形成を増強するための方法に関する。また、本発明は、これらの化合物を含むキットに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

止血は、血管壁に対する傷害後に循環血液に暴露された組織因子(TF)と総FVIIタンパク質質量の約1%に対応する量の循環中に存在するFVIIaとの間の複合体の形成によって開始される。この複合体は、TFを有する細胞にアンカーされ、細胞表面においてFXをFXaに、およびFIXをFIXaに活性化する。FXaは、プロトロンピンをトロンピンに活性化し、これがFVIII、FV、FXI、およびFXIIIを活性化する。さらに、この止血における初期段階で形成される限られた量のトロンピンが、血小板を活性化する。血小板に対するトロンピンの作用に続き、これらは形を変えて、それらの表面に電荷をもったリン脂質を露出する。この活性化された血小板の表面は、さらなるFX活性化および完全なトロンピン生成のための鑄型を形成する。活性化された血小板表面において、活性化された血小板の表面上に形成

10

20

30

40

50

されたFIXa-FVIIIa複合体を経てさらなるFXの活性化が生じ、次いでFXaは、プロトロンピンをトロンピンに転換するが、依然として表面上にある。次いで、トロンピンは、フィブリノーゲンを、不溶性であり、かつ初期の血小板栓を安定化するフィブリンに転換する。このプロセスにより、TFを発現または暴露する部位に区画化、すなわち局在化され、これにより、凝固系が全身的に活性化するリスクを最小にしている。栓を形成する不溶性のフィブリンは、FXIIIで触媒されるフィブリン線維の架橋によってさらに安定化される。

#### 【0003】

FVIIaは、主に単鎖酵素前駆体として血漿中に存在し、これがFXaによって、その2本鎖の活性型のFVIIaに切断される。組換え活性型VIIa因子(rFVIIa)は前止血性(pro-haemostatic)の薬剤として開発されている。rFVIIaの投与により、抗体形成のために凝固因子産物で治療することができない出血を有する血友病被検者において、迅速かつ非常に有効な前止血性の反応を提供する。また、VII因子を欠損する出血被験者または正常な凝固系を有するが、過剰の出血を受けている被験者は、FVIIaでうまく治療することができる。これらの研究において、好ましくないrFVIIaの副作用(特に血栓塞栓症の発生)には、遭遇しなかった。

10

#### 【0004】

外因的に投与されたFVIIaは、活性化された血小板表面におけるトロンピンの形成を増大する。これは、FIXまたはFVIIIを欠いた血友病被検者において生じ、したがって、完全なトロンピン形成のための最も強力な経路を欠いている。また、血小板数の低下または機能に欠陥がある血小板の存在下では、余分なFVIIaが、トロンピン形成を増大してしまう。

20

#### 【0005】

組換えヒトFVIIaの商業的な製剤は、NovoSeven(登録商標)(NovoNordiskA/S, Denmark)として販売されている。NovoSeven(登録商標)は、血友病AおよびBの患者における出血の発症の治療のために指定されており、有効かつ信頼できる出血の発症の治療のための、市場において入手可能な唯一の組換えFVIIaである。

#### 【0006】

トロンピンで活性化可能な線維素溶解阻害剤(Thrombin-activatable-fibrinolysis-inhibitor:TAFI)は、線維素溶解の強力阻害剤として作用する、C末端アルギニンおよびリジン残基に対して特異性を有する血漿カルボキシペプチダーゼである(Nesheimら、Thromb. Haemost. 78:386, 1997)。これは、以前にクローニングされた血漿カルボキシペプチダーゼB(Eatonら、J. Biol. Chem. 269:21833, 1991)、および以前に単離したカルボキシペプチダーゼU(Wangら、J. Biol. Chem. 269:15937, 1994)と同一である。この単鎖の60.000Mのポリペプチドは、約70nMの濃度で血漿中に循環しており(Bajzarら、Blood 88:2093, 1997)、トロンピンの存在下において、限定的な加水分解を受け、これによりその活性化が引き起こされる。活性カルボキシペプチダーゼ(活性型TAFI(TAFIa))は、フィブリン凝塊に関して、C末端リジンおよびアルギニンの除去を触媒する。これらの残基は、線維素溶解性タンパク質の構築のために必須であるので、これらを除去することにより、線維素溶解がダウンレギュレートされる。

30

#### 【0007】

手術または主要な外傷に付随して過度に出血し、輸血の必要がある被検者では、いかなる出血も受けていない人々よりも多くの合併症を発病することが周知である。しかし、また、人の血液または血液製剤の投与を必要とする適度な出血(凝固欠陥の治療のための血小板、白血球、血漿に由来する濃縮物、その他)では、ヒト・ウイルス(肝炎、HIV、パルボウイルス、およびその他の現在未知のウイルス)を伝達するリスクに関連した合併症を引き起こすかもしれない。大量の輸血を必要とする大量の出血は、肺および腎機能の障害を含む多臓器不全の発症を引き起こすかもしれない。一旦被検者がこれらの深刻な合併症を発症すると、多くのサイトカインおよび炎症反応に関与するイベントのカスケードが開始され、どのような治療も極めて困難となり、残念なことにうまくいかないことが多い。したがって、手術における、並びに主要な組織損傷の治療における主な目標は、出血を

40

50

避けること、または最小にすることである。このような出血を避けるため、または最小にするために、線維素溶解酵素によって容易に溶解されない安定な、および堅固な止血栓の形成を確実にすることが重要である。さらに、このような栓または血餅の迅速かつ効率的な形成を確実にすることは、重要である。

【0008】

今日、外傷被害者および手術に付随して出血している被験者を含む、出血の発症を受けている被験者は、いくらかのFVIIaの注射または輸液によって治療されることが多く、FVIIaの短い半減期(2.5時間)のため、特定のレベルの止血能を維持するために一回以上の投与が必要とされる。より迅速な出血の阻止は、このような被験者に対して重要な利益となろう。そうなれば、出血を止めて、止血し続けるために必要な投与数が減少するのである。

10

【0009】

欧州特許第225.160号(Novo Nordisk)は、凝固因子の欠陥または凝固因子阻害剤によって引き起こされるものではない出血障害の治療のための、FVIIa組成物および方法に関する。欧州特許第82.182号(Baxter Travenol Lab.)は、被験者において、血液凝固因子の欠陥に、または血液凝固因子に対する阻害剤の効果に対抗する際に使用するためのVIIa因子の組成物に関する。

【0010】

国際特許公開番号W093/06855(Novo Nordisk)は、FVIIaの局所適用に関する。

【0011】

米国特許第5206161号、第536493号、および第5593674号は、単離された単量体のヒト・カルボキシペプチダーゼB(PCPB)、PCPBを作成するための発現ベクターおよび宿主細胞、およびPCPBを血液に加えることを含む、血液を凝固するための方法に関する。

20

【0012】

当該技術分野において、出血の発症が、手術、外傷、またはその他の形態の組織損傷；多回輸血された被験者における凝固障害を含む凝固障害の誘導；肝機能の減少(「肝疾患」)を含む、先天性または後天性の凝固または出血の障害；血小板機能の欠陥または血小板数の減少；凝固に必須の「化合物」(たとえば、血小板またはフォンビルブランド因子タンパク質)の欠乏または異常；線維素溶解の増大；抗凝固療法または血栓溶解療法；または幹細胞移植によるものである被験者を含む、出血の発症を受けている被験者の治療を改善する必要性がなお存在する。

30

【0013】

当該技術分野において、改善された、信頼のおける、かつ広く適用できる、凝固を増強するか、安定な止血栓の形成を確実にするもしくは増強するか、または治療される被験者のための便宜を増強するか、または被験者、特にトロンビン生成が損なわれている被験者における完全な止血を達成する方法が必要なままである。また、出血の阻止時間が短縮された方法の要求がある。

【発明の開示】

【0014】

発明の概要

本発明の1つの目的は、出血の発症および凝固障害の治療または予防において有効に使用することができる組成物を提供することである。

40

【0015】

本発明の第2の目的は、出血の発症の治療もしくは予防に、または凝血原として、有効に使用することができる単一の単位剤形の組成物を提供することである。本発明のもう一つの目的は、相乗効果を示す組成物、治療方法、またはキットを提供することである。

【0016】

本発明さらなる目的は、凝固系の全身的な高レベルの活性化などの、実質的な副作用を示さない組成物、治療方法、またはキットを提供することである。

【0017】

50

本発明のその他の目的は、本明細書を読むことによって明らかとなるであろう。

【0018】

第1の側面において、本発明は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む薬学的組成物を提供する。

【0019】

第2の側面において、本発明は、出血の発症の治療剤を含むパーツのキットであって、

a) 第1の単位剤形の、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の有効な量、および薬学的に許容されるキャリア；

b) 第2の単位剤形の、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の有効な量、および薬学的に許容されるキャリア；および

c) 前記第1および第2の剤形を含むための容器手段、を含むパーツのキットを提供する。

10

【0020】

第3の側面において、本発明は、被検者の出血の発症を治療するための薬物の製造のための、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドと組み合わせたVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの使用を提供する。さらなる側面において、本発明は、被検者の出血の発症を治療するための薬物の製造のための、請求項1~18のいずれか1項に記載の組成物の使用を提供する。

【0021】

その異なる態様において、薬物は、完全な止血を得るために必要な時間を減少するため、止血を維持するために必要な時間を減少するため、凝固時間を減少するため、血餅溶解時間を延長するため、および血餅強度を増大するためのものである。

20

【0022】

異なる態様において、薬物は、手術、外傷、または組織損傷のその他の形態による出血の発症；多回輸血された被検者における凝固障害を含む凝固障害；肝機能の減少（「肝疾患」）を含む、先天性または後天性の凝固または出血の障害；血小板機能の欠陥または血小板数の減少；必須凝固「化合物」（たとえば、血小板またはフォンビルブランド因子タンパク質）の欠乏または異常；線維素溶解の増大；抗凝固療法または血栓溶解療法；または幹細胞移植による出血の発症を受けている被検者を治療するためのものである。一連の態様において、出血は、脳、内耳領域、目、肝臓、肺、腫瘍組織、消化管などの器官において生じ；一連のもう一つの態様において、これは、出血性胃炎およびおびただしい子宮出血におけるものなどの、びまん性出血である。一連のもう一つの態様において、出血の発症は、急性の関節出血（haemarthroses）（関節の出血）、慢性血友病の関節症、血腫（たとえば筋肉、後腹膜、舌下、および咽頭後方のもの）、その他の組織における出血、血尿（腎尿管（renal tract）からの出血）、大脳出血、手術（たとえば、肝切除）、抜歯、および胃腸出血（たとえば、UGIの出血）を有する被験者における手術または外傷と関連した出血である。1つの態様において、薬物は、被検者における、外傷、または手術、または血小板の数もしくは活性の低下のための出血の発症を治療するためのものである。

30

【0023】

さらなる側面において、本発明は、被検者における出血の発症を治療するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に出血を治療するために有効である方法を提供する。

40

【0024】

さらなる側面において、本発明は、被検者における凝固時間を減少するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に凝固時間を減少するために有効である方法を提

50

供する。

【0025】

さらなる側面において、本発明は被検者における止血を増強する方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に止血を増強するために有効である方法を提供する。

【0026】

さらなる側面において、本発明は、被検者における血餅溶解時間を延長するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与

10

【0027】

さらなる側面において、本発明は、被検者における血餅強度を増大するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に血餅強度を増大するために有効である方法を提供する。

【0028】

本方法の1つの一連の態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、単一の単位剤形で投与される。

20

【0029】

もう一つの一連の態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を含む第1の単位剤形およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む第2の単位剤形の形態で投与される。その一連の態様において、第1の単位剤形および前記第2の単位剤形は、15分を超えて時間を離して投与されない。

【0030】

さらなる側面において、本発明は、出血の発症のための治療剤を含むキットであって、  
d) VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの有効な量、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの有効な量、および薬剤的に許容されるキャリアの単一剤形；および、  
e) 前記単一の単位剤形を含むための容器手段、  
を含むキットを提供する。

30

【0031】

本発明の1つの一連の態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、VII因子関連ポリペプチドである。本発明の1つの一連の態様において、VII因子関連ポリペプチドは、VII因子アミノ酸配列変異体である。1つの態様において、VII因子関連ポリペプチドの活性と天然のヒトVIIa因子（野生型FVIIa）の活性との間の比は、本明細書に記載されたとおりの「インビトロ加水分解アッセイ法」で試験したときに、少なくとも約1.25である。

40

【0032】

本発明の1つの一連の態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、前記VII因子である。1つの態様において、前記VII因子は、ヒトVII因子である。1つの態様において、前記VII因子は、ウシ、ブタ、イヌ、マウス、ウマ、またはサケのVII因子である。もう一つの態様において、VII因子は、組換えによって作製される。もう一つの態様において、VII因子は、血漿に由来する。好ましい態様において、VII因子は、組換えヒト因子VIIである。本発明の1つの一連の態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、その活性型である。本発明の1つの好ましい態様において、VII因子は、組換えヒトVIIa因子である。

【0033】

50

一連の態様において、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、TAFI関連ポリペプチドである。1つの態様において、TAFI関連ポリペプチドは、TAFIアミノ酸配列の変異体である。1つの態様において、TAFI関連ポリペプチドの活性と天然のヒト血漿TAFI(野生型TAFI)の活性との間の比は、本発明に記載されたとおりの「TAFIアッセイ法」で試験したときに、少なくとも約1.25である。1つの態様において、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、TAFIポリペプチドである。1つの態様において、TAFIは、ヒトTAFIである。1つの態様において、TAFIは、ウシ、ブタ、イヌ、マウス、ウマ、またはサケのTAFIである。好ましい態様において、TAFIは、組換えによって作製される。もう1つの態様において、TAFIは、血漿に由来する。好ましい態様において、TAFI子は、組換えヒトTAFIである。本発明の1つの一連の態様において、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、その活性型である。1つの態様において、TAFI関連ポリペプチドは、TAFIの断片である。1つの態様において、TAFI関連ポリペプチドは、ハイブリッドTAFIポリペプチド、たとえばブタ/ヒトのハイブリッドである。1つの態様において、TAFIは、ヒト活性型TAFI(TAFIa)である。

10

## 【0034】

1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、約100:1および約1:100(w/vVII因子:TAFI)の間の質量比で存在する。

## 【0035】

1つの態様において、VII因子関連ポリペプチドは、野生型VII因子と比較して、20以下のアミノ酸が、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸配列変異体である(すなわち、米国特許第4,784,950に開示されたアミノ酸配列を有するポリペプチド)。もう一つの態様において、VII因子変異体は、15以下のアミノ酸が置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸配列変異体である。その他態様において、VII因子変異体は、野生型のVII因子と比較して8、6、5、または3アミノ酸などの10以下のアミノ酸が置換され、欠失され、または挿入されている。1つの態様において、VII因子変異体は、以下の一覧から選択される:L305V-FVIIa、L305V/M306D/D309S-FVIIa、L3051-FVIIa、L305T-FVIIa、F374P-FVIIa、V158T/M298Q-FVIIa、V158D/E296V/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、およびS336G-FVII。

20

30

## 【0036】

さらなる態様において、VII因子関連ポリペプチドは、天然のヒト凝固VIIa因子と比較して、組織因子非依存的な活性が増大されている。もう1つの態様において、増大された活性は、基質特異性の変化を伴わない。本発明のもう1つの態様において、組織因子に対するVII因子関連ポリペプチドの結合は、損なわれず、VII因子関連ポリペプチドは組織因子に結合したときに、少なくとも野生型のVIIa因子の活性を有する。

## 【0037】

好ましい態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびVII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、組換えヒトVIIa因子および組換えヒトTAFIである。

## 【0038】

1つの態様において、哺乳類の血液において凝固時間が減少される。もう1つの態様において、哺乳類の血液において、止血が増強される。もう1つの態様において、哺乳類の血液において、血餅溶解時間が延長される。もう1つの態様において、哺乳類の血液において、血餅強度が増大される。1つの態様において、哺乳類の血液は、ヒト血液である。もう1つの態様において、哺乳類の血液は、正常なヒト血液であり;1つの態様において、血液は、トロンピン生成が損なわれている被検者からの血液であり;1つの態様において、血液は、1つまたは複数の凝固因子の欠損を有する被検者からの血液であり;もう1つの態様において、血液は、1つまたは複数の凝固因子に対する阻害剤を有する被検者からの血液であり;1つの態様において、血液は、フィブリノーゲンの濃度が低下された被検者からのものであり;1つの態様において、血液は、TAFIポリペプチドを欠損したヒト血

40

50

液である。1つの一連の態様において、血液は、血漿である。

【0039】

本発明の1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、組成物に含まれる唯一の止血性薬剤である。もう1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、組成物に含まれる唯一の活性化止血性薬剤である。もう1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、被検者に投与される唯一の凝固因子である。本発明の1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、患者に投与される唯一の活性薬剤である。1つの態様において、組成物は、実質的にトロンビンまたはプロトロンビンを含まない；もう1つの態様において、組成物は、実質的にFXを含まない；もう1つの態様において、組成物は、実質的にFXaを含まない。

10

【0040】

もう1つの態様において、薬学的組成物は、静脈内投与、好ましくは注射または注入、特に注射のために処方される。1つの態様において、組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤またはキャリアを含む。

【0041】

本発明の1つの態様において、組成物は、単一の単位剤形であって、単一の単位剤形は、両方の凝固因子を含む。本発明の1つの態様において、組成物は、第1の単位剤形としてVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を、および第2の単位剤形としてTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含み、かつ前記第1および第2の剤形を含むための容器手段を含むパーツのキットの形態である。1つの態様において、組成物またはキットは、適用できるものとして、組成物または分離した成分のそれぞれを投与するための説明書をさらに含む。

20

【0042】

本発明の1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、単一剤形で投与される。本発明の1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を含む第1の単位剤形およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む第2の単位剤形の形態で投与される。

30

【0043】

本発明の1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、同時に投与される。もう1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、逐次に投与される。1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、15分、好ましくは10分、より好ましくは5分、より好ましくは2分を超えて時間を離して投与されない。1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、2時間まで、好ましくは1~2時間、より好ましくは1時間まで、より好ましくは30分~1時間、より好ましくは30分まで、より好ましくは15~30分まで時間を離して投与される。

40

【0044】

1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの有効な量は、約0.05mg/日~約500mg/日(70kgの被験者)である。1つの態様において、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の有効な量は、約0.01mg/日~約500mg/日(70kgの被験者)である。

【0045】

1つの態様において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、約100:1および約1:100(w/wVII因子:TAFI)の間の質量比で存在する。

【0046】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、単一の単位剤形であり、かつ本質的にV

50

II因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、並びにプロテインC阻害の標品、並びに薬学的に許容されるキャリア、安定剤、界面活性剤、中性塩、抗酸化剤、保存剤、およびプロテアーゼ阻害剤のリストから選択される1つまたは複数の成分からなる。

【0047】

本発明のもう1つの態様において、薬学的組成物は、本質的にVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品並びに薬学的に許容されるキャリア、安定剤、界面活性剤、中性塩、抗酸化剤、保存剤、およびプロテアーゼ阻害剤のリストから選択される1つまたは複数の成分からなる第1の単位剤形と共に、並びに本質的にTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品並びに薬学的に許容されるキャリア、安定剤、界面活性剤、中性塩、抗酸化剤、保存剤、およびプロテアーゼ阻害剤のリストから選択される1つまたは複数の成分からなる第2の単位剤形と共に、パーツのキットの形態である。

10

【0048】

さらなる態様において、被検者はヒトであり；もう1つの態様において、被検者は、トロンビン生成が損なわれており；1つの態様において、被検者は、フィブリノーゲンの血漿濃度が低下されており（たとえば、多回輸血された被検者）；1つの態様において、被検者は、VIII因子またはFIXを因子の血漿濃度が低下されている。

【0049】

もう一つの側面において、本発明は、唯一の凝固タンパク質としてVII因子で被検者を治療したときと比較して、VII因子応答性症候群をわずらっている被検者における止血を増強する方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に止血を増強するために有効である方法に関する。

20

【0050】

もう一つの側面において、本発明は、被検者のトロンビン形成を増強するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共にトロンビン形成を増強するために有効である方法に関する。

【0051】

もう一つの側面において、本発明は、唯一の凝固タンパク質としてVII因子で被検者を治療したときと比較して、VII因子応答性症候群をわずらっている被検者におけるトロンビン形成を増強する方法であって該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共にトロンビン形成を増強するために有効である方法に関する。

30

【0052】

もう一つの側面において、本発明は、唯一の凝固因子タンパク質としてVII因子を被検者に投与したときに必要な投与数と比較して、VII因子応答性症候群をわずらっている被検者における止血を達成するために必要な凝固因子タンパク質の投与数を減少するための方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に凝固因子タンパク質の投与数を減少するために有効である方法に関する。

40

【0053】

もう一つの側面において、本発明は、VII因子応答性症候群をわずらっている被検者における出血を治療する方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に出血を治療するために有効である方法に関する。

50

## 【0054】

1つの態様において、VII因子は、ヒト組換えVIIa因子（rFVIIa）である。もう一つの態様において、rFVIIaは、Novo Seven（登録商標）（Novo NordiskA/S、Bagsvaerd、Denmark）である。

## 【0055】

もう一つの側面において、本発明は、哺乳類の血漿においてフィブリン血餅形成を増強するための薬物の製造のための、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドと組み合わせたVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの使用に関する。

## 【0056】

もう一つの側面において、本発明は、被検者におけるフィブリン血餅形成を増強する方法であって、該方法は、その必要がある被検者に対して、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の第1の量と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の第2の量とを投与することを含み、前記第1および第2の量は、共に出血を治療するために有効である方法に関する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0057】

本発明の詳細な記載

手術または主要な外傷に関連して過度に出血し、輸血の必要がある被検者では、いかなる出血も経験していない人々よりも多くの合併症を発病する。しかし、彼らが人血または血液製剤（凝固欠陥の治療のための血小板、白血球、血漿に由来する由来する濃縮物、その他）の投与を必要とする場合は、これによりヒト・ウイルス（肝炎、HIV、パルボウイルス、およびその他の現在未知のウイルス）並びに非ウイルス病原を伝達するリスクがあるので、適度な出血でも合併症を引き起こすかもしれない。一旦被検者がこれらの深刻な合併症を発病すると、多くのサイトカインおよび炎症反応に関与するイベントのカスケードが開始され、どのような治療も極めて困難となり、残念なことにうまくいかないことが多い。大部分の血液の損失を経験している患者は、臨床的に不安定になる。このような患者は、心房細動を受けるリスクがあり、これにより心臓活動の致命的な停止；腎機能障害；または、肺（いわゆる「湿性肺」またはARDS）において流体血管外遊走を生じる可能性もある。したがって、手術における、並びに主要な組織損傷の治療における主な目標は、出血を避けること、または最小にすることである。このような望ましくない出血を避けるため、または最小にするために、線維素溶解酵素によって容易に溶解されない安定な、および固体の止血栓の形成を確実にすることが重要である。さらに、このような栓または血餅の迅速かつ効率的な形成を確実にすることは、重要である。

## 【0058】

また、血小板減少症の（血小板の数または活性が低下された）被検者は、トロンピン生成が損なわれており、並びにフィブリン栓の安定化が不完全であることにより、途中で溶解されやすい止血栓を生じる。さらに、主要な外傷または器官損傷を受けた被検者は、結果として、頻繁に輸血が行われ、血小板数の低下、並びにフィブリノーゲン、VIII因子、およびその他の凝固タンパク質レベルが低下されることが多い。これらの被検者は、トロンピン生成の障害（または、低下）を経験する。したがって、これらの被検者では、止血に欠陥があるか、またはほとんど効果がなく、タンパク質分解酵素によって容易に、および途中で溶解されるフィブリン栓を形成することになり、そのうえこのような酵素は、広範な外傷および器官損傷によって特徴づけられる局面において広範囲に放出される。

## 【0059】

また、組織の出血により、血腫を形成する可能性もある。血腫の大きさ（特に、頭蓋内および脊髄内における）は、神経機能の損失の程度、リハビリの困難さ、および/または損失およびリハビリ後の神経機能の永久的な減失の重篤さおよび程度と密接に関連がある。最も重篤な血腫の結果は、これらが脳に位置するときに見られ、これらにより、患者の死亡さえも引き起こすであろう。

## 【0060】

したがって、出血の治療における主要な目的は、最短時間で止血を行い、従って、失血を最小にしておくことである。

【0061】

したがって、本発明は、このような治療を必要とする被検者における出血の発症の治療のための治療の、有益な組成物、使用、および方法を提供する。有益な組成物、使用、および方法は、止血が行われる前に失血を少なくすること、手術の際に必要なとされる血液を少なくすること、止血が行われるまで血圧を許容されるレベルに保持すること、血圧のより迅速な安定化、治療された患者の回復時間を短縮すること、治療された患者のリハビリ時間を短くすること、脳血腫を含む血腫の形成の減少または血腫の形成を小さくすること、迅速な出血の抑止、出血の停止および止血の維持のために必要な投与数の減少などの有益な効果に關与しているであろう。

10

【0062】

TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品と組み合わせて、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、たとえばVIIa因子の標品を投与することにより、VIIa因子またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのいずれかが単独で投与されるとき凝固時間、血餅の堅固さ、および耐性と比較して、凝固時間の短縮、堅固な血餅、および線維素溶解に対する耐性の増大がもたらされる。

【0063】

また、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品と組み合わせて、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、たとえばVIIa因子の標品を投与することにより、VIIa因子またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのいずれかが単独で投与されるとき状況と比較して、出血の抑止を行うための時間の減少および止血を維持するための投与数の減少がもたらされる。本発明は、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品およびVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品の同時または逐次の投薬における有益な効果を提供する。本発明に従った薬学的組成物は、単一の組成物の形態であってもよく、または多成分性のキット（パーツのキット）の形態であってもよい。本発明に従った組成物は、ヒトなどの霊長類を含む哺乳類において、治療的および予防的な凝血原として有用である。本発明は、ヒトを含む被検者における出血の発症を治療する（予防的に治療することまたは防止することを含む）ための方法をさらに提供する。

20

【0064】

第1または第2または第3の、その他の単位用量がこの明細書の全体にわたって言及されるが、これは、投与の好ましい順序を示すのではなく、単に便宜上の目的でなされるだけである。

30

【0065】

VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の組み合わせは、短い凝固時間、止血栓の迅速な形成、および安定な止血栓の形成を確実にする有利な製品である。VII因子またはVII因子関連ポリペプチドおよびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせは、堅固な、安定な、かつ迅速に形成される止血栓の形成を確実にする有利な製品であることが、本発明の発明者によって見いだされた。

【0066】

本発明の発明者は、VIIa因子およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせが、VIIa因子またはTAFIのいずれか単独よりも効率的に血餅の堅固さを増大することができることが示された。また、TAFIによってさらなる血餅の堅固さの増大が観察されない濃度において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドを組み合わせることにより、血餅の堅固さのさらなる増大が観察されることを示したのは予想外であった。また、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドおよびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせが、VIIa因子またはTAFIのいずれか単独よりも効率的に正常なヒト血漿におけるインピトロでの血餅溶解時間を引き延ばすことができることが示された。また、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドおよびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせが、VIIa因子またはTAFIのいずれか単独よりも効率的に正常のヒト血漿における半分の血餅溶解時間を引き延ばす

40

50

ことができることが示された。また、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドおよびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせが、VIIa因子またはTAFIのいずれか単独よりも効率的に正常のヒト血漿における線維素溶解、特にtPAを媒介した線維素溶解から血餅を保護することができることが示された。

【0067】

したがって、凝固を増強することにより、被験者の出血のより有効な治療を得ることができる。

【0068】

理論によって義務づけられることは望まないが、完全なトロンビン生成は、堅固で安定な止血栓を形成するために、またその結果、止血の維持のために必要であると考えられている。このような栓のフィブリン構造は、形成されるトロンビンの量および初期のトロンビン生成速度に依存的である。障害性のトロンビン生成の存在下では、非常に浸透性の多孔性フィブリン栓が形成されている。通常フィブリン表面に存在する線維素溶解性酵素は、容易にこのようなフィブリン栓を溶解する。また、安定なフィブリン栓の形成は、トロンビンによって活性化されるXIIIa因子の存在に依存的であり、したがって完全なトロンビン生成にも依存的である。さらに、最近記載されたトロンビンを活性化できる線維素溶解性阻害剤のTAFIは、その活性化のためにむしろ多量のトロンビンを必要とする。完全に十分ではないトロンビン生成の存在下では、TAFIは活性化されず、したがって正常な線維素溶解活性による正常な分解よりも容易な止血栓の形成を生じる。血小板数が低下した状況である血小板減少症では、外因性の余分のVIIa因子の投与によって、より迅速なトロンビン生成が開始される。しかし、総トロンビン生成は、高濃度のVIIa因子によってさえ正常化されない。

【0069】

フィブリノーゲンの血漿濃度が低下した被検者（多くの外傷または広範な手術の結果として多回輸血された被検者）では、完全なトロンビン活性化は起こらない。次いで、VII因子およびTAFIを組み合わせることで、より有効な止血が行われる。

【0070】

血小板減少症の被検者は、障害性トロンビン生成並びにフィブリン栓の安定化の欠陥がもたらされ、途中で溶解されやすい止血栓を生じる。さらに、主要な外傷または組織損傷を受けた被検者は、結果として、頻りに輸血が行われており、血小板数が低下され、並びにフィブリノーゲン、VIII因子、およびその他の凝固タンパク質のレベルの低下してしまう。これらの被検者は、トロンビン生成の障害（または、低下）を経験する。加えて、これらのフィブリノーゲン・レベルの低下は、ネガティブにXIII因子の活性化を妨げる。したがって、これらの被検者は、止血に欠損があるか、またはあまり効率的でなく、タンパク質分解酵素によって、加えてこのような酵素は、広範な外傷および器官損傷によって特徴づけられる状況で広範囲に放出されることによって、容易にかつ途中で溶解されるフィブリン栓の形成を引き起こす。

【0071】

被検者の止血を維持するための完全な能力を有する完全に安定化された栓の形成を容易にするために、本発明に従った組成物は投与される。この組成物は、特に血小板数が低下した被検者において、並びにフィブリノーゲンおよび/またはその他の凝固タンパク質の血漿レベルが低下した被検者において、有益である。

【0072】

VII因子ポリペプチド：

本発明を実施する際に、出血を防止または治療するために有効な任意のVII因子ポリペプチドを使用してもよい。これは、血液もしくは血漿に由来するか、または組換え手段によって産生されたVII因子ポリペプチドを含む。

【0073】

本発明は、たとえば米国特許第4,784,950号（野生型ヒトVII因子）に開示されたアミノ酸配列を有するものなどのVII因子ポリペプチドを含む。一部の態様において、VII因子は

、たとえば米国特許第4,784,950号(野生型VII因子)に開示されたようなヒトVIIa因子ポリペプチドである。一連の態様において、VII因子ポリペプチドは、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも約50%、および最も好ましくは少なくとも約70%のヒトVIIa因子の特異的な生物活性を示すポリペプチドを含む。一連の態様において、VII因子ポリペプチドは、少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約100%、好ましくは少なくとも約120%、より好ましくは少なくとも約140%、および最も好ましくは少なくとも約160%のヒトVIIa因子の特異的な生物活性を示すポリペプチドを含む。一連の態様において、VII因子ポリペプチドは、米国特許第4,784,950号に開示されたとおりの野生型VII因子の配列と少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%の一致性を示すポリペプチドを含む。

10

#### 【0074】

本明細書で使用されるものとして、「VII因子ポリペプチド」は、VII因子、並びにVII因子関連ポリペプチドを含むが、限定されない。「VII因子」の用語は、野生型ヒトVII因子(米国特許第4,784,950号に開示されたもの)、並びにたとえばウシ、ブタ、イヌ、マウス、およびサケVII因子などのその他の種に由来する野生型VII因子のアミノ酸配列1-406を有するポリペプチドを含むことが企図されるが、限定されず、前記VII因子は、血液もしくは血漿に由来するか、または組換え手段によって産生される。これには、1つの個体から別の個体に存在し、および生じるであろう、VII因子の天然の対立形質の変異をさらに含む。また、糖鎖形成またはその他の翻訳後修飾の程度および部位は、選択した宿主細胞および宿主細胞の環境の性質に依存して異なるであろう。また、「VII因子」の用語は、VII因子ポリペプチドの未切断(酵素前駆体)の形態、並びにタンパク分解でプロセスされてこれらのそれぞれの生理活性の形態に産生された、VIIa因子と称されるものを含むことが企図される。典型的には、VII因子は、残基152および153の間で切断されてVIIa因子を産生する。

20

#### 【0075】

「VII因子関連ポリペプチド」は、ヒトVII因子と比較して化学的に修飾されたか、および/またはヒトVII因子と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列の変化を含む(すなわちVII因子変異体)か、および/またはヒトVII因子と比較して切断されたアミノ酸配列を含む(すなわちVII因子断片)、いずれかのVII因子ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。このようなVII因子関連ポリペプチドは、ヒトVII因子と比較して、安定度、リン脂質結合、変更された比活性などを含む異なる特性を示してもよい。「VII因子関連ポリペプチド」の用語は、このようなポリペプチドの未切断(酵素前駆体)の形態、並びにタンパク分解性にプロセスされてこれらのそれぞれの生理活性の形態に産生された「VIIa因子関連ポリペプチド」または「活性化されたVII因子関連ポリペプチド」と称されるものを含むことが企図される。

30

#### 【0076】

本明細書に使用されるものとして、「VII因子関連ポリペプチド」は、野生型のヒトVII因子と比較して、実質的に同等または改善された生物活性を示すポリペプチド、並びに野生型ヒトVIIa因子の活性と比較して、VIIa因子生物活性が実質的に修飾され、または減少したポリペプチドを含むが、限定されない。これらのポリペプチドは、化学的に修飾されたVII因子またはVIIaおよび特定のアミノ酸配列の変化が導入されて、ポリペプチドの生理活性が修飾されまたは崩壊されたVII因子変異体を含むが、これらに限定されない。

40

#### 【0077】

わずかに修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、たとえばN末端アミノ酸の欠失もしくは付加を含む修飾されたN末端を有するされたポリペプチド、および/またはヒトVIIa因子と比較して化学的に修飾されたポリペプチドを含む。

#### 【0078】

VII因子の変異体を含むVII因子関連ポリペプチドは、実質的に野生型VII因子と同等もしくは優れた生理活性を示すか、または代わりに、野生型VII因子と比較して修飾され、

50

もしくは減少した生理活性を示すかどうかにかかわらず、VII因子の変異体を含み、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失、または置換によって野生型VII因子の配列と異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0079】

変異体を含むVII因子関連ポリペプチドは、上記の通りに凝固アッセイ法、タンパク質分解アッセイ法、またはTF結合アッセイ法の1つまたは複数において試験したときに、同じ細胞タイプにおいて産生された野生型VIIa因子の比活性の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約110%、少なくとも約120%、または少なくとも約130%を示すものを含む。

10

【0080】

変異体を含むVII因子関連ポリペプチドは、野生型VIIa因子と比較して実質的に減少された生物活性を有し、上記の通りに凝固アッセイ法、タンパク質分解アッセイ法、またはTF結合実験の1つまたは複数において試験したときに、同じ細胞タイプにおいて産生された野生型VIIa因子の比活性の少なくとも約25%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約100%、より好ましくは少なくとも約110%、より好ましくは少なくとも約120%、およびもっとも好ましくは少なくとも約130%を示すものを含む。

【0081】

変異体を含み、野生型VIIa因子と比較して実質的に同等または改善された生物活性を有するVII因子関連ポリペプチドは、上記の通りに凝固アッセイ法、タンパク質分解アッセイ法、またはTF結合実験の1つまたは複数において試験したときに、同じ細胞タイプにおいて産生された野生型VIIa因子の比活性の多くとも約25%、好ましくは多くとも約10%、より好ましくは多くとも約5%、最も好ましくは多くとも約1%を示すものである。野生型VII因子と比較して実質的に修飾された生物活性を有するVII因子変異体は、TF非依存性のX因子タンパク分解活性を示すVII因子変異体、およびTFに結合するが、X因子を切断しないものを含むが、これらに限定されない。

20

【0082】

一部の態様において、VII因子ポリペプチドは、VII因子関連ポリペプチド、特に、「インビトロ加水分解アッセイ法」（下記の「アッセイ法」を参照されたい）で試験したときに、前記VII因子ポリペプチドの活性と天然のヒトVIIa因子（野生型FVIIa）の活性との間の比が少なくとも約1.25であり；その他の態様において、比は、少なくとも約2.0であり；さらなる態様において、比は、少なくとも約4.0である変異体である。

30

【0083】

本発明の一部の態様において、VII因子ポリペプチドは、VII因子関連ポリペプチド、特に、「インビトロ加水分解アッセイ法」（下記の「アッセイ法」を参照されたい）で試験したときに、前記VII因子ポリペプチドの活性と天然のヒトVIIa因子（野生型FVIIa）の活性との間の比が少なくとも約1.25であり；その他の態様において、比は、少なくとも約2.0であり；さらなる態様において、比は、少なくとも約4.0である変異体であり；さらなる態様において、比は、少なくとも約8.0である変異体である。

40

【0084】

一部の態様において、VII因子ポリペプチドは、たとえば米国特許第4,784,950号（野生型VII因子）に開示されたとおりのヒトVII因子である。一部の態様において、VII因子ポリペプチドは、ヒトVIIa因子である。一連の態様において、VII因子ポリペプチドは、ヒトVIIa因子の生物比活性の少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも約50%、および最も好ましくは少なくとも約70%を示すVII因子関連ポリペプチドである。一部の態様において、VII因子ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失、または置換によって野生型VII因子の配列と異なるアミノ酸配列を有する。

【0085】

野生型VIIa因子と比較して、実質的に同等または優れた生物活性を有するVII因子の変

50

異体の非限定の例は、デンマーク特許出願番号第PA2000 00734およびPA2000 01360 (W001/83725に対応する) およびPA2000 01361 (W002/22776に対応する) 号に記載されたいるものを含むが、これらに限定されない。野性型VII因子と実質的に同等または改善された生物活性を有するVII因子変異体の非限定の例は、S52A-FVII、S60A-FVII (Iinoら、Arch. Biochem. Biophys. 352 : 182-192, 1998) ; L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII、L3051-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、およびS336G-FVII ; 米国特許第5,580,560号に開示したとおりの、増大されたタンパク分解性の安定度を示すFVIIa変異体 ; 残基290および291の間または残基315および316の間でタンパク質加水分解で切断されたVIIa因子 (Mollerupら、Biotechnol. Bioeng. 48: 501-505, 1995) ; 並びにVIIa因子の酸化型 (Kornfeltら、Arch. Biochem. Biophys. 363: 43-54, 1999) を含む。野生型VII因子と比較して、実質的に減少したまたは修飾された生物活性を有するVII因子変異体の非限定の例は、R152E-FVIIa (Wildgooseら、Biochem 29 : 3413-3420, 1990) 、S344AFVIIa (Kazamaら、J. Biol. Chem. 270:66-72, 1995) 、FFR-FVIIa (Holstら、Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15: 515-520, 1998) 、およびGlaドメインを欠いているVIIa因子 (Nicolaisenら、FEBS Letts. 317: 245-249, 1993) を含む。化学的に修飾されたVII因子ポリペプチドおよび配列変異体の非限定の例は、たとえば米国特許第5,997,864号に記載されている。

10

20

#### 【0086】

血液凝固におけるVIIa因子の生物活性は、これが(i)組織因子(TF)に結合する能力、および(ii)IX因子またはX因子のタンパク分解性の切断を触媒して、活性化されたIX因子またはX因子を産生する(それぞれIXa因子またはXa因子)能力に由来する。

#### 【0087】

本発明の目的のために、VII因子ポリペプチド(「VII因子生物活性」)の生物活性は、たとえば米国特許第5,997,864号に記載されているとおり、VII因子が欠損した血漿およびトロンボプラスチンを使用して、標品が血液凝固を促進する能力を測定することによって定量してもよい。このアッセイ法において、生物活性は、対象試料と比較した凝固時間の減少として現され、1単位/mlのVII因子活性を含むプールされたヒト血清標準と比べることにより「VII因子単位」に転換する。あるいは、VIIa因子生物活性は、

30

(i)脂質膜およびX因子に包埋されたTFを含む系において、VIIa因子またはVIIa因子関連ポリペプチドが活性化されたX因子(Xa因子)を産生する能力を測定すること(Perssonら、J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997) ;

(ii)水性系におけるX因子の加水分解を測定すること(「インピトロ・タンパク質分解アッセイ法」、下記を参照されたい) ;

(iii)表面プラスモン共振に基づいた機器を使用して、VIIa因子またはVIIa因子関連ポリペプチドのTFに対する物理的な結合を測定すること(Persson, FEBS Letts. 413: 359-363, 1997) ; および、

(iv) VIIa因子および/またはVIIa因子関連ポリペプチドによる合成基質の加水分解を測定すること(「インピトロ加水分解アッセイ法」、下記を参照されたい) ; および、

40

(v) TF非依存的なインピトロ系におけるトロンピン生成の測定、  
によって定量してもよい。

#### 【0088】

「VII因子の生物活性」または「VII因子の活性」の用語は、トロンピンを生成する能力を含むことが企図され ; 該用語は、組織因子の非存在下で活性化された血小板の表面においてトロンピンを生成する能力も含む。

#### 【0089】

本発明に従って使用してもよいVIIa因子標品は、NovoSeven(登録商標)(Novo Nordisk AIS, Bagsvaerd, Denmark)であるが、限定されない。

50

## 【0090】

TAFIポリペプチド：

本発明は、たとえば米国特許第5206161号および5364934号（野生型ヒトTAFI）に開示されたアミノ酸配列を有するものなどのTAFIポリペプチドを含む。

## 【0091】

本発明を実施する際に、出血を防止するまたは治療する際に有効である任意のTAFIポリペプチドを使用してもよい。これには、血液または血漿に由来するTAFIポリペプチドまたは組換え手段によって産生されるTAFIポリペプチドを含む。

## 【0092】

本明細書に使用されるものとして、「TAFIポリペプチド」は、TAFI並びにTAFI関連ポリペプチドを含むが、限定されない。「TAFI」の用語は、野生型ヒトTAFI（米国特許第5206161号および第5364934号に開示したとおり）並びにたとえば、ウシ、ブタ、イヌ、マウス、およびラットTAFIなどのその他の種に由来する野生型TAFIのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むことが企図されるが、これらに限定されない。

## 【0093】

1つの個体から別の個体に存在し、および生じるであろう、VII因子の天然の対立形質の変異をさらに包含する。また、糖鎖形成またはその他の翻訳後修飾の程度および部位は、選択した宿主細胞および宿主細胞の環境の性質に依存して異なるであろう。また、「TAFI」の用語は、TAFIポリペプチドの未切断（酵素前駆体）の形態、並びにタンパク分解性にプロセスされてこれらのそれぞれの生理活性の形態にプロセスされた、TAFIaと称されるものを含むことが企図される。

## 【0094】

「TAFI関連ポリペプチド」は、ヒトTAFIと比較して化学的に修飾されたか、および/またはヒトTAFIと比較して1つまたは複数のアミノ酸配列の変化を含む（すなわちTAFI変異体）か、および/またはヒトTAFIと比較して切断されたアミノ酸配列を含む（すなわちTAFI断片）、いずれかのTAFIポリペプチドを含むが、これらに限定されない。このようなTAFI関連ポリペプチドは、ヒトTAFIと比較して、安定度、リン脂質結合、変更された比活性などを含む異なる特性を示してもよい。

## 【0095】

「TAFI関連ポリペプチド」の用語は、このようなポリペプチドの未切断（酵素前駆体）の形態、並びにタンパク分解性にプロセスされてこれらのそれぞれの生理活性の形態に産生された「活性化されたTAFI関連ポリペプチド」と称されるものを含むことが企図される。

## 【0096】

本明細書に使用されるものとして、「TAFI関連ポリペプチド」は、野生型のヒトTAFIと比較して、実質的に同等または改善された生物活性を示すポリペプチド、並びに野生型ヒトTAFIの活性と比較して、TAFI生物活性が実質的に修飾され、または減少したポリペプチドを含むが、限定されない。これらのポリペプチドは、化学的に修飾されたTAFIまたはTAFIaおよび特定のアミノ酸配列の変化が導入されて、ポリペプチドの生理活性が修飾されまたは崩壊されたTAFI変異体を含むが、これらに限定されない。

## 【0097】

わずかに修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、たとえばN末端アミノ酸の欠失もしくは付加を含む修飾されたN末端を有するされたポリペプチド、および/またはヒトTAFIと比較して化学的に修飾されたポリペプチドをさらに含む。

## 【0098】

TAFIの変異体を含むTAFI関連ポリペプチドは、実質的に野生型TAFIと同等もしくは優れた生理活性を示すか、または代わりに、野生型TAFIと比較して修飾され、もしくは減少した生理活性を示すかどうかにかかわらず、TAFIの変異体を含み、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失、または置換によって野生型TAFIの配列と異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0099】

変異体を含むTAFI関連ポリペプチドは、本明細書に記載した通りにTAFI活性アッセイ法において試験したときに、同じ細胞タイプにおいて産生された野生型TAFIの比活性の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約110%、少なくとも約120%、または少なくとも約130%を示すものを含む。

## 【0100】

変異体を含むTAFI関連ポリペプチドは、野生型TAFIと比較して実質的に同等または改善された生物活性を有し、記載した通りに特異的なTAFI活性アッセイ法の1つまたは複数において試験したときに、同じ細胞タイプにおいて産生された野生型ヒトTAFIの比活性の少なくとも約25%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約100%、より好ましくは少なくとも約110%、より好ましくは少なくとも約120%、および最も好ましくは少なくとも約130%を示すものを含む。本発明の目的において、TAFIの生物活性は、たとえばBoffaら (J. Biol. Chem. 1998; 273: 2127-2135) に記載されているような、標品がtPAを媒介した血餅溶解またはプラスミンを媒介した血餅溶解を阻害する能力を測定することによって定量されてもよい。両方のアッセイ法において、生物活性は、対象試料と比較して、血餅溶解時間の減少として表される。あるいは、TAFIの生物活性は、たとえば、Boffaら (J. Biol. Chem. 1998; 273: 2127-2135) に記載されているように、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドによる合成基質の加水分解を測定して

10

20

## 【0101】

変異体を含み、野生型TAFIと比較して実質的に同等または改善された生物活性を有するTAFI関連ポリペプチドは、記載した通りに特異的なTAFI活性アッセイ法の1つまたは複数において試験したときに、同じ細胞タイプにおいて産生された野生型TAFIの比活性の多くとも約25%、好ましくは多くとも約10%、より好ましくは多くとも約5%、最も好ましくは多くとも約1%を示すものである。

## 【0102】

TAFI相当物の非限定の例は、たとえばBajzarら (J. Biol. Chem. 1995; 270: 14477) またはEatonら、(J. Biol. Chem. 1991; 266: 21833) に記載したとおりの血漿由来のヒトTAFI; たとえば米国特許第5206161号および第5364934号に記載されたとおりの組換えヒトTAFI; たとえば国際公開番号W000/06671に記載されたとおりのヒト脳カルボキシペプチダーゼB; たとえばW000/61727に記載されたとおりの脾臓のカルボキシペプチダーゼB; W098/35988に記載されたとおりの修飾されたプロドメインを有するカルボキシペプチダーゼB; W097/07769に記載されたとおりの変異カルボキシペプチダーゼB; たとえばMarxら (Thromb. Haemost., 2000; 83: 297-303) に記載されたとおりのマウスTAFI; たとえば米国5672496に記載されたとおりのブタTAFIを含む。

30

## 【0103】

一部の態様において、TAFIは、「tPA媒介血餅溶解アッセイ法」(上記にBoffaらを参照されたい)において試験したときに、前記TAFIポリペプチドの活性と天然のヒトTAFI(野生型TAFI)の活性との間の比が少なくとも約1.25であるTAFI相当物であり; その他の例では、比は少なくとも約2.0であり; さらなる態様において、比は少なくとも約4.0である。

40

## 【0104】

一部の態様において、TAFIは、「tPA媒介血餅溶解アッセイ法」(上記にBoffaらを参照されたい)において試験したときに、前記TAFIポリペプチドの活性と天然のヒトTAFI(野生型TAFI)の活性との間の比が少なくとも約1.25であるTAFI相当物であり; その他の例では、比は少なくとも約2.0であり; さらなる態様において、比は少なくとも約4.0である。

## 【0105】

また、TAFI関連ポリペプチドは、これらの特徴の止血に関連した活性を保持するTAFIの断片またはTAFI関連ポリペプチドを含む。TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの止血に関連

50

した活性は、たとえば、本願明細書（上記にBoffaらを参照されたい）に記載されているTAFI活性アッセイ法を使用して測定してもよい。

【0106】

好ましい態様において、TAFIは、ヒト血漿TAFIであるか、または活性化ヒト血漿TAFIaである。もう一つの態様において、TAFIは、組換えで作成される。

【0107】

定義

従来の意味で使用されにおいて、アミノ酸の3文字または1文字の表示は、表1に示したとおり、これらの従来の意味で使用した。明示的に示されない限り、本明細書において言及されるアミノ酸は、Lアミノ酸である。最初の文字は、たとえばK337において、野生型VIIa因子の位置において天然に存在するアミノ酸を表し、たとえば、[K337A]-FVIIaは、示された位置において天然に存在する1文字コードKによって表されるアミノ酸が、1文字コードAによって表されるアミノ酸によって置換されたFVII-変異体を示すことは、よく理解されている。

10

【0108】

表1:

アミノ酸のための略語:

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
グリシン	Gly	G
プロリン	Pro	P
アラニン	Ala	A
バリン	Val	V
ロイシン	Leu	L
イソロイシン	Ile	I
メチオニン	Met	M
シスチン	Cys	C
フェニルアラニン	Phe	F
チロシン	Tyr	Y
トリプトファン	Trp	W
ヒスチジン	His	H
リジン	Lys	K
アルギニン	Arg	R
グルタミン	Gln	Q
アスパラギン	Asn	N
グルタミン酸	Glu	E
アスパラギン酸	Asp	D

20

30

「VIIa因子」または「FVIIa」の用語は、交換可能に使用されてもよい。

【0109】

この文脈において、「トロンビン生成の障害を有する被検者」は、活性化された血小板表面において完全なトロンビンのバーストを生成することができな被験者を意味し、正常な量および機能の凝固因子、血小板、およびフィブリノーゲン（たとえば、プールされた、正常ヒト血漿のもの）を含む、完全に機能する、正常な止血剤系を有する被験者におけるトロンビン生成よりも少ないトロンビンの生成を有する被検者を含み、VIII因子を欠いた被験者；血小板数の低下または機能に欠陥のある血小板を有する被験者（たとえば、血小板減少症またはグランツマン血小板無力症または多量に出血した被験者）；プロトロンビン、FXまたはFVIIのレベルが低下した被検者；いくつかの凝固因子のレベルが低下した被験者（たとえば、外傷または広範な手術の結果として過剰な出血によるもの）；および、フィブリノーゲンの血漿濃度が低下した被検者（たとえば、多回輸血された被検者）を含むが、限定されない。

40

50

## 【0110】

「トロンビン生成のレベル」または「正常なトロンビン生成」は、健康者のレベルと比較した患者のトロンビン生成のレベルを意味する。レベルは、正常レベルの割合として示される。本用語は、適切な場合には、交換可能に使用される。

## 【0111】

「止血系を増強すること」の用語は、トロンビンを生成する能力の増強を意味する。「止血を増強する」の用語は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む試験試料についてトロンビン生成を測定したときに、同じトロンビン生成アッセイ法で試験したときの、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドまたはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのみをそれぞれ含む対象試料における個々のトロンビン生成と比較して延長されるの状況を含むことが企図される。トロンビン生成は、本記述のトロンビン生成アッセイ法に記載したようにアッセイしてもよい（「アッセイ法の部」を参照されたい）。

## 【0112】

本明細書において使用される「唯一の」薬剤または因子は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドが、共に、薬学的組成物またはキットに含まれる唯一の止血剤もしくは活性な止血剤もしくは凝固因子であるか、または特定の治療の過程において、たとえば特定の出血の発症の過程などにおいて、患者に投与した唯一の止血剤もしくは活性な止血剤もしくは凝固因子である状況をいう。これらの状況は、その他の止血剤または凝固因子が、1つまたは複数の凝固パラメータに有意に影響するように、適用可能なものとして、十分な量または活性で存在しないものを含むことが理解される。

## 【0113】

血餅溶解時間、血餅強度、フィブリン血餅形成、および凝固時間は、患者の止血系の状態を検定するために使用される臨床的パラメータである。血液試料は、適切な間隔で患者から吸い出し、たとえばMehら、Blood Coagulation & Fibrinolysis 2001 ; 12: 627637 ; Vigら、Hematology, Vol. 6 (3) pp. 205-213 (2001) ; Vigら、Blood coagulation & fibrinolysis, Vol. 12 (7) pp. 555-561 (2001) Oct ; Gliddenら、Clinical and applied thrombosis/hemostasis, Vol. 6 (4) pp. 226-233 (2000) Oct ; McKenzieら、Cardiology, Vol. 92 (4) pp. 240-247 (1999) Apr ; or Davisら、Journal of the American Society of Nephrology, Vol. 6 (4) pp.1250-1255 (1995)に記載されているように、トロンボエラストグラフィによって1つまたは複数のパラメータをアッセイする。

## 【0114】

「血餅溶解時間を引き延ばすこと」の用語は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む試験試料について血餅溶解時間を測定したときに、同じ血餅溶解アッセイ法で試験したときの、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドまたはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのみをそれぞれ含む対象試料における個々の血餅溶解時間と比較して延長されるの状況を含むことが企図される。血餅溶解時間は、上記の通りにアッセイしてもよい。

## 【0115】

「血餅強度を増大すること」の用語は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む試験試料について血餅強度、たとえば機械強度を測定したときに、同じ血餅強度アッセイ法で試験したときの、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドまたはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのみをそれぞれ含む対象試料における個々の血餅溶解時間と比較して増大される状況を含むことが企図される。血餅強度は、たとえばCarrら (Carr ME, Zekert SL. Measurement of platelet-mediated force development during plasma clot formation. AM J MED SCI 1991; 302: 13-8)に記載されたように、または上記の通りにトロンボエラストグラフィによってアッセイしてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0116】

「フィブリン血餅形成を増強すること」の用語は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む試験試料についてフィブリン血餅形成の速度または程度を測定したときに、同じ凝固アッセイ法で試験したときの、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドまたはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのみをそれぞれ含む対象試料における個々のフィブリン血餅形成の速度または程度と比較して増大される状況を含むことが企図される。フィブリン血餅形成は、上記の通りにアッセイしてもよい。

## 【0117】

「凝固時間を短縮すること」の用語は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む試験試料について血餅形成の時間（凝固時間）を測定したときに、同じ凝固アッセイ法で試験したときの、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドまたはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドのみをそれぞれ含む対象試料における個々の凝固時間と比較して増大される状況を含むことが企図される。凝固時間は、当業者に既知の標準的なPtまたはaPTTアッセイ法によってアッセイしてもよい。

## 【0118】

「血小板の数または活性の低下」の用語は、被検者の血漿中に存在する血小板（platelet）（血小板：thrombocyte）の数、およびこのような血小板の生物学的な凝固に関連した活性をいう。数の低下は、たとえば血小板破壊の増大、血小板産生の減少、および脾臓における血小板の通常画分より多くのプールによるものであってもよい。血小板減少症は、たとえば、150,000血小板/マイクロリットルよりも少ない血小板数として定義され；一般に、正常な血小板数の上限は、350,000および450,000血小板/マイクロリットルの間であるためと考えられる。血小板数は、自動化された血小板計数器によって計数されてもよく；これは、当業者に周知の方法である。血小板数の低下による症候群としては、血小板減少症、凝固障害（coagulopathy）を含むが、これらに限定されない。「活性」には、血小板の凝集、接着、および血液凝固活性を含むが、これらに限定されない。活性の減少は、たとえば糖タンパク質異常、異常な膜-細胞骨格相互作用、血小板顆粒の異常、血小板血液凝固活性の異常、シグナル伝達および分泌の異常によるものを含む。凝集、接着、および血液凝固活性を含む血小板活性は、当業者既知の標準的な方法によって測定してもよく、たとえば、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, Collier, Kipps & Seligsohn, 2001, McGraw-Hill.を参照されたい。血小板活性の低下による症候群には、گرانツマン血小板無力症、ベルナル スリエ症候群、抗凝血薬療法、および血栓溶解治療を含むが、限定されない。「低下」は、同じアッセイ法において測定したときの、正常なプールされた血漿の試料の数または活性と比較した試験血漿の試料の数または活性をいう。

## 【0119】

本明細書において使用するものとして、「出血障害」の用語は、出血の発症の際に現れる、先天性の、後天性の、または誘導される、細胞または分子起源のいずれかの欠損を反映する。出血障害の例は、凝固因子欠損（たとえば、凝固因子VIII、IX、XIまたはVIIの欠損）、凝固因子阻害剤、血小板機能の欠陥（たとえば、گرانツマン血小板無力症、ベルナル スリエ症候群）、血小板減少症、フォンウィルブランド病、および凝固タンパク質の希釈によって生じるものなどの凝固障害、出血および/または輸液による線維素溶解の増大および血小板数の低下（たとえば、手術または外傷を受けた多回輸血された被験者のもの）を含むが、これらに限定されない。

## 【0120】

出血は、循環系の任意の構成要素から血液が血管外遊走することをいう。「出血の発症」の用語は、手術、外傷、その他の形態の組織の損害と関連して、望まれず、抑制できず、およびしばしば過剰である出血、並びに出血障害を有する被検者における望まれない出

10

20

30

40

50

血を含むことを意味する。出血の発症は、基本的には正常な凝固系を有するが、(一時的な)凝固障害を受けている被験者において、並びに先天性のまたは後天性の凝固障害または出血障害を有する被験者において、生じるであろう。血友病における止血系では、必須の凝固「化合物」(たとえば、血小板またはフォンビルブランド因子タンパク質)を欠いているか、または異常であるために、血小板機能の欠陥を有する被験者における出血は、血友病によって引き起こされる出血に関連づけられるであろう。たとえば手術または莫大な外傷に関連して、広範な組織損傷を受けている被験者では、正常な止血機構による即時性の止血の要求によっては手に負えず、彼らは、基本的には(外傷前または手術前には)正常な止血機構であるにもかかわらず過剰の出血を発生してしまうであろう。さらに、このようなしばしば多回輸血された被験者は、出血および/または輸液の結果として、(一時的な)凝固障害(すなわち、出血および/または輸液による、凝固タンパク質の希釈、線維素溶解の増大、および血小板数の低下)を発病する。出血は、また、脳、内耳領域、および目などの器官においても生じるであろうし;これらにおいては、外科的な止血の可能性が制限されており、従って、満足な止血を達成するのに問題がある領域である。同様の問題は、種々の器官(肝臓、肺、腫瘍組織、胃腸管)からの生検を行うプロセスにおいて、並びに腹腔鏡検査手術および根治的な恥骨後前立腺摘除術においても起こるであろう。これら全ての状況において共通することは、出血がびまん性である場合(たとえば出血性胃炎および大量の子宮出血)にも、手術の技術(縫合、クリップ、その他)によって止血を実現することが困難なことである。また、出血は、与えられた治療によって止血の欠陥が誘導される抗凝固療法の被験者において生じるであろうし;これらの出血は、急性および大量であることが多い。抗凝固療法は、血栓塞栓性疾患を防止するために行われることが多い。このような治療は、ヘパリン、その他の形態のプロテオグリカン、ワルファリンまたはその他の形態のビタミンK-アンタゴニスト、並びにアスピリンおよびたとえば抗体などのその他の血小板凝集阻害剤またはその他のGPIIb/IIIa活性阻害剤を含むであろう。また、出血は、抗血小板剤(たとえば、アセチルサリチル酸)、抗凝固薬(たとえば、ヘパリン)、および線維素溶解素(たとえば、組織プラスミノゲンアクチベータ、tPA)と組み合わせた治療を含む、いわゆる血栓溶解療法によるものであってもよい。また、出血の発症は、急性の関節出血(haemarthroses)(関節の出血)を有する被験者、慢性血友病の関節症、血腫(たとえば筋肉、後腹膜、舌下、および咽頭後方のもの)、その他の組織における出血、血尿(腎尿管(renal tract)からの出血)、大脳出血、手術(たとえば、肝切除)、抜歯、および胃腸出血(たとえば、UGIの出血)を有する被験者における手術または外傷と関連した出血を含むことが意図されるが、これらに限定されない。出血の発症は、VIII因子に対する阻害剤;血友病A;血友病Aと阻害剤;血友病B;VII因子の欠損;TAFIの欠損;血小板減少症;フォンビルブランド因子の欠損(フォンビルブランド病);重篤な組織損傷;重篤な外傷;手術;腹腔鏡検査手術;出血性胃炎;生検採取;抗凝固剤療法;上胃腸出血(upper gastrointestinal bleedings:UGI);または幹細胞移植に関連していてもよい。出血の発症は、大量の子宮出血;機械的な止血の可能性が制限されている器官において生じるもの;脳において生じるもの;内耳領域において生じるもの;または、目元において生じるものであってもよい。「出血の発症」および「出血」の用語は、適切な場合は、交換可能に使用されてもよい。

#### 【0121】

この文脈において、「治療」の用語は、たとえば手術におけるものなどの予想される出血を防止すること、およびたとえば外傷におけるものなどのすでに起こっている出血を、出血を阻害するか、または最小にする目的で、調節することの両者を含むことが意図される。上述した「予想される出血」は、特定の組織または器官において起こると思われる出血であってもよく、または詳細不明の出血であってもよい。したがって、VII因子またはVIII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の予防的投与は、「治療」の用語に含まれる。

#### 【0122】

本明細書に使用されるものとして、「被験者」の用語は、任意の動物、特にヒトなどの

10

20

30

40

50

哺乳類を意味することが企図され、適切な場合は、「患者」の用語と交換可能に使用されてもよい。また、本発明は、獣医学の手順の範囲内におけるVII因子またはFVII関連ポリペプチド、およびtPA阻害剤の使用を含む。

【0123】

本明細書において定義されたVII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、同時に、または逐次に投与されてもよい。本因子は、単一の剤形に両方の凝固因子を含む単一の剤形において、または第1の単位剤形としてVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を、第2の単位剤形としてTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含むパーツのキットの形態で供給されてもよい。第1または第2または第3の、その他の単位用量は、この明細書の全体にわたって言及されるが、これは、投与の好ましい順序を示すのではなく、単に便宜上の目的でなされるだけである。

10

【0124】

VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の「同時」投薬は、単一の単位剤形での凝固因子の投与、または第1の凝固因子タンパク質の投与に続き、第2の凝固因子タンパク質の投与が、15分、好ましくは10分、より好ましくは5分、より好ましくは2分を超えて時間を離されていないことを意味する。何れの因子が最初に投与されてもよい。

【0125】

「逐次」の投薬は、第1の凝固因子タンパク質の投与に続き、第2の凝固因子タンパク質の投与が、2時間まで、好ましくは1~2時間、より好ましくは1時間まで、より好ましくは30分~1時間、より好ましくは30分まで、より好ましくは15~30分まで時間を離して投与されることを意味する。2つの単位剤形、または凝固因子タンパク質のいずれかが最初に投与される。好ましくは、両製品が同じ静脈を利用することにより注射される。

20

【0126】

「TAFIのレベル」または「TAFIレベル」は、健康な被験者におけるレベルと比較した患者の凝固TAFI活性を意味する。該レベルは、正常レベルの割合として表される。本邦語は、適切な場合には、交換可能に使用される。

【0127】

「TAFIのレベルの減少」または「TAFIレベルの減少」は、TAFI凝固の欠損またはTAFI凝固の阻害剤を有さない被検者集団における平均TAFIレベルと比較した、血流におけるTAFIの存在もしくは活性の減少または活性を意味する。循環しているTAFIのレベルは、凝固剤または免疫アッセイ法のいずれかによって測定することができる。TAFIの凝血原な活性は、患者の血漿がTAFIを欠損する血漿における凝固時間を修正する能力によって決定される（たとえばAPTTアッセイ法、下記参照されたい；また、本明細書の「アッセイ法の部分」を参照されたい）。

30

【0128】

1単位のTAFIは、1ミリリットルの正常な（プールされた）ヒト血漿に存在するTAFIの量（100%のTAFIレベルに対応する）として定義した。1単位のVII因子は、1mlの正常血漿に存在するVII因子の量として定義され、約0.5 $\mu$ gタンパク質に対応する。活性化された後では、50単位は、約1gのタンパク質に対応する。

40

【0129】

「欠損」は、たとえば正常な健康な個々のものと比較して、血漿中のVII因子の存在または活性が減少することを意味する。本用語は、適切な場合には、「減少したVII因子レベル」と交換可能に使用されてもよい。

【0130】

「APTT」または「aPTT」は、活性化された部分的トロンボプラスチン時間を意味する（たとえば、Proctor RR, Rapaport SI : The partial thromboplastin time with kaolin ; a simple screening test for first-stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 36: 212,1961に記載されている）。

【0131】

50

「TAFI応答性の症候群」は、その必要がある被検者に投与された外因性のTAFIにより、該症候群によって引き起こされる、予測され、もしくは存在する、いずれかの徴候、症状、または疾病が、防止、治癒、または回復されるであろう症候群を意味する。TAFIのレベルの減少によって引き起こされる症候群、たとえばTAFIに対する阻害剤によって引き起こされる出血障害を含むが、限定されない。TAFI応答性の症候群は、本発明に従った組成物で治療してもよい。

【0132】

「VII因子応答性の症候群」は、その必要がある被検者に投与された外因性のVII因子、好ましくはVIIa因子により、該症候群によって引き起こされる、予測され、もしくは存在する、いずれかの徴候、症状、または疾病が、防止、治癒、または回復されるであろう症候群を意味し、凝固因子VIII、IX、XIまたはVIIレベルの減少、凝固因子阻害剤、血小板機能の欠陥（たとえば、グランツマン血小板無力症、ベルナル スリエ症候群）、血小板減少症、フォンウィルブランド病、および凝固タンパク質の希釈によって生じらるものなどの凝固障害、出血および/または輸液による線維素溶解の増大および血小板数の低下（たとえば、手術または外傷を受けた多回輸血された被験者のもの）によって引き起こされる症候群が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0133】

「半減期」は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの血漿濃度が、特定の値からその値の半分まで減少するために必要とされる時間をいう。

20

【0134】

「一次止血」は、FXaおよびTF:VIIa因子によるトロンビンの初期の生成、その後の血小板の活性化および活性化されて、接着された血小板による初期のゆるい栓の形成であって、フィブリンによって、最終的に架橋されたフィブリンによってまだ安定化されていないものを意味する。

【0135】

「二次止血」または「止血の維持」は、二次的な、完全かつ主要な、トロンビンのバーストまたは生成であって、活性化された血小板表面において生じ、かつVIIIa因子およびVIIIa因子によって触媒され、その後のフィブリンの形成および初期の血小板栓の安定化を意味する。フィブリンによる栓の安定化によって、完全な止血がなされる。

30

【0136】

「完全な止血」は、傷害の部位における安定かつ堅固なフィブリンの血餅または栓の形成であって、有効に出血を止め、線溶系によって容易に溶かされないものを意味する。この文脈において、止血の用語は、上記の通りに完全な止血を表すために使用される。

【0137】

標品中の総タンパク量は、一般に既知の方法によって、たとえば光学濃度を測定することによって測定してもよい。TAFI凝固またはVII因子タンパク質（「抗原」）の量は、標準的なElisa免疫アッセイ法などの一般に既知の方法によって測定してもよい。一般的な用語として、このようなアッセイ法は、たとえばTAFIタンパク質を含有する標品の溶液を、elisaプレート上に結合された抗TAFI抗体と接触させて、その後固定された抗体-TAFI複合体を、マーカーを有する抗TAFI二次抗体と接触させ、その量を第3の工程において測定することによって行われる。それぞれの凝固因子の量は、同様の方法において適切な抗体を使用して測定してもよい。標品中に存在する凝固因子タンパク質の総量は、個々の凝固因子タンパク質の量を加えることによって決定される。1つの態様において、標品は、単離された凝固因子を含む。もう1つの態様において、標品は、凝固因子IIおよび凝固因子IIa（プロトロンビンおよびトロンビン）および/またはXもしくはXa因子を本質的に含まない。

40

【0138】

本明細書において使用されるものとして、「単離された」の用語は、凝固因子、たとえばTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドであって、これらが合成された細胞から分離されたも

50

の、あるいはそれらが天然に発見される媒体（例えば、血漿または血液）から分離されたものをいう。これらの起源の細胞に由来するポリペプチドの分離は、当該技術分野において既知の任意の方法によって達成されてもよく、接着細胞の培養物から所望の産物を含む細胞培養培地を取り出すこと；非接着細胞を遠心分離または濾過して取り出すことなどを含むが、これらに限定されない。これらが天然に存在する媒体からのポリペプチドの分離は、当該技術分野において既知の任意の方法によって達成されてもよく、たとえば、抗VII因子または抗TAFI抗体のそれぞれのカラムなどにおける、アフィニティークロマトグラフィ；疎水性相互作用クロマトグラフィ；イオン交換クロマトグラフィ；サイズ排除クロマトグラフィ；電気泳動的な手順（たとえば調製用の等電点電気泳動（IEF））、溶解度の差（たとえば、硫酸アンモニウム沈殿）、または抽出などを含むが、これらに限定されるものではない。 10

【0139】

本発明の範囲内において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの「有効な量」は、共に、疾患およびその合併症を治癒する、軽減する、または部分的に抑えるために、出血もしくは失血を防止または減少するために十分な、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、たとえばFVIIa、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの量として定義される。

【0140】

「VIIa因子の活性」または「VIIa因子活性」の用語は、トロンビンを生成する能力を含み；本用語には、組織因子の非存在下で活性化された血小板の表面においてトロンビンを生成する能力も含む。 20

【0141】

略語：

TF            組織因子  
 FVII        VII因子の単鎖、不活性化型  
 FVIIa       VII因子の活性化型  
 rFVIIa      組換えVII因子の活性化型  
 TAFI        TAFIの酵素前駆体、不活性化型  
 TAFIa      TAFIの活性化型  
 rTAFI      組換えTAFI  
 rTAFIa     組換えTAFIa

30

化合物の調製：

本発明に使用するために適したヒト精製VIIa因子は、たとえばHagenら、Proc. Natl. A cad. Sci. USA 83：2412-2416、1986に記載されているように、または欧州特許番号第200.421号（ZymoGenetics）に記載されているように、好ましくはDNA組換え技術によって作成される。

【0142】

また、VII因子は、Broze and Majerus, J. Biol. Chem. 255（4）：1242-1247、1980並びにHedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71：1836-1841、1983に記載されている方法によって産生されてもよい。これらの方法では、検出可能な量のその他の血液凝固因子を伴わずにVII因子を産生する。さらに精製VII因子標品は、最終的な精製工程としてさらなるゲル濾過を含むことによって得てもよい。次いで、既知の手段によって、たとえば、VII因子はTAFIa、IX、またはXaなどの異なるいくつかの血漿タンパク質によって、VII因子を活性化VIIa因子に変換してもよい。あるいは、Bjoernら（Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565）によって記載されているように、VII因子をMono Q（登録商標）（Pharmacia fine Chemicals）などのイオン交換クロマトグラフィーに通すことにより、活性化してもよい。 40

【0143】

VII因子関連ポリペプチドは、野生型VII因子の修飾によって、または組換え技術によって 50

産生した。野生型VII因子と比較したときにアミノ酸配列が変化したVII因子関連ポリペプチドは、周知の手段により、たとえば部位特異的突然変異により天然のVII因子をコードする核酸において、アミノ酸コドンを変えることによって、またはいくつかのアミノ酸コドンを除去することによって、野生型VII因子をコードする核酸配列を修飾することによって産生されてもよい。

#### 【0144】

VIIa因子またはTAFI分子の機能に重要な領域の外側に置換を作成し、なおも活性なポリペプチドを生じさせることができることは当業者にとは明らかであろう。VII因子もしくはVII因子関連ポリペプチド、またはTAFIもしくはTAFI関連ポリペプチドの活性に必須であり、従って、好ましくは、置換を受けないアミノ酸残基は、部位特異的突然変異生成またはアラニン走査変異生成（たとえば、CunninghamおよびWells, 1989, Science 244: 1081-1085を参照されたい）などの当該技術分野において既知の手順に従って同定されてもよい。後者の技術では、分子において正に荷電したすべての残基に変異が導入され、生じる変異体分子では、分子の活性に重要であるアミノ酸残基を同定するために、凝固剤について、架橋性活性をそれぞれ試験する。また、基質-酵素の相互作用部位は、核磁気共鳴解析、結晶学、または光親和性標識化（たとえば、de Vosら、1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaverら、1992, FEBS Letters 309: 59-64を参照されたい）などの技術によって決定される、三次元構造解析によって決定することもできる。

#### 【0145】

1つのヌクレオチドをもう一つのヌクレオチドに交換するための、核酸配列への突然変異を導入は、当該技術分野において既知の任意の方法を使用して、部位特異的変異誘発によって達成されてもよい。関心対象のインサートを有するスーパーコイル二重鎖DNAベクターおよび所望の変異を含む2つの合成プライマーを利用する手順が、特に有用である。ベクターの反対の鎖に対してそれぞれ相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを、*pfu* DNAポリメラーゼによって温度サイクリングの間に伸長した。プライマーの取り込みにより、スタガー・ニックを含む変異プラスミドを産生する。温度サイクリングの後、メチル化およびヘミメチル化されたDNAに特異的であるDpnIで産物を処理して、親のDNA鋳型を消化し、変異を含有する合成DNAを選択する。遺伝子混合技術またはファージディスプレイ技術などの、変異体を作成、同定、および単離するための当該技術分野において既知のその他の手順を使用してもよい。

#### 【0146】

これらの起源の細胞に由来するポリペプチドの分離は、当該技術分野において既知の任意の方法によって達成されてもよく、付着した細胞培養から所望の産物を含む細胞培養培地を除去すること；非接着細胞を遠心分離または濾過して除去することなどを含むが、これらに限定されない。任意には、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドをさらに精製してもよい。精製は、たとえば抗VII因子抗体カラム（たとえば、Wakabayashiら、J. Biol. Chem. 261: 11097, 1986 ; and Thimら、Biochem. 27: 7785, 1988を参照）などのアフィニティークロマトグラフィ；疎水性相互作用クロマトグラフィ；イオン交換クロマトグラフィ；サイズ排除クロマトグラフィ；電気泳動的な手順（たとえば調製用の等電点電気泳動（IEF）、溶解度の差（たとえば、硫酸アンモニウム沈殿）または抽出などを含む、これに限定されない、当該技術分野において既知の任意の方法を使用して達成されてもよい。一般に、Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York, 1982 ; およびProtein Purification, J. C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989を参照されたい。精製後、本標品は、宿主細胞に由来する非VII因子または非VII因子関連ポリペプチドを好ましくは約10重量%未満、より好ましくは約5%未満、および最も好ましくは約1%未満で含む。

#### 【0147】

VII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、XIa因子またはたとえば、IXa因子、カリクレイン、Xa因子、およびトロンピンなどのトリプシン様の特異性を有するその他のプロテ

10

20

30

40

50

アーゼを使用するタンパク分解性の切断によって活性化されてもよい。たとえばOsterudら、Biochem. 11: 2853 (1972) 米国特許第4,456,591号; およびHednerら、J. Clin. Invest. 71: 1836 (1983)を参照されたい。あるいは、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、Mono Q(登録商標)(Pharmacia fine Chemicals)などのイオン交換クロマトグラフィーに通すことにより、活性化してもよい。次いで、生じる活性化されたVII因子またはVII因子関連ポリペプチドは、後述するように処方し、および投与する。

#### 【0148】

本発明の範囲内の用途のためのTAFIは、(Bajzarら、J. Biol. Chem. 270: 14477,1995)に開示されたものなどの既知の方法に従って、血漿から単離されてもよい。しかし、疾患伝染のリスクを有する血液または組織に由来する産物の使用を避けるために、組換えTAFIを使用することが好ましい。組換えTAFIを調製するための方法は、当該技術分野において既知であり; たとえば、Voffaら、J. Biol. Chem. 273: 2127,1998) およびEatonら、J. Biol. Chem. 266: 21833,1991を参照されたい。活性化されたTAFIは、たとえば、国際公開番号W096/23064(Biotechnology General)に記載されている。TAFI変異体は、上記の通りに部位特異的突然変異誘発によって作製されてもよい。

#### 【0149】

TAFI関連ポリペプチドは、野生型TAFIの修飾によって、または組換え技術によって産生されてもよい。野生型TAFIと比較したときにアミノ酸が変更されているTAFI関連ポリペプチドは、周知の手段、たとえば上記のより多詳細に説明したように、部位特異的突然変異により、天然のTAFIをコードする核酸のアミノ酸コドンを変更することによって、またはいくつかのアミノ酸コドンを除去することによってのいずれかにより、野生型TAFIをコードする核酸配列を修飾することによって産生されてもよい。これらの起源細胞からのポリペプチドの分離は、当該技術分野において既知のいずれの方法によって達成されてもよく、所望の産物を含む細胞培養培地を付着した細胞培養から除去すること; 遠心分離または濾過して非接着細胞を除去すること; および同様のものを含むが、これらに限定されない。任意には、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、さらに精製されてもよい。精製は、当業者に既知の任意の方法を使用して達成されてもよく、たとえば上記のより詳細に説明したように、アフィニティークロマトグラフィー; を含むが、抗TAFI抗体カラム上; 疎水性相互作用クロマトグラフィー; イオン交換クロマトグラフィー; サイズ排除クロマトグラフィー; 電気泳動的な手順(たとえば調製用の等電点電気泳動(IEF))、溶解度の差(たとえば、硫酸アンモニウム沈殿)、または抽出などを含むが、これらに限定されるものではない。精製に続いて、本標品は、宿主細胞に由来する非TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを約10重量%未満、より好ましくは約5%未満、および最も好ましくは約1%未満で含む。次いで、生じる活性化されたTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを処方して、後述するように投与される。

#### 【0150】

当業者には理解されるであろうが、免疫応答を誘導するリスクを減少するために、被検者と同質遺伝子的なTAFIポリペプチドおよびVII因子ポリペプチドを使用することが好ましい。非非違とTAFIの調製および特徴付けは、Marxら、Thromb. Haemost. 83: 297, 2000に記載されている。また、本発明は、獣医学の手順の範囲内における、このようなTAFIポリペプチドおよびVII因子ポリペプチドの使用を含む。

#### 【0151】

##### 薬学的組成物および使用方法

本発明の標品は、たとえば凝固因子VIII、IX、XIまたはVIIレベルの減少、凝固因子阻害剤、血小板機能の欠陥(たとえば、グランツマン血小板無力症、ベルナル スリエ症候群)、血小板減少症、フォンウィルブランド病、および凝固タンパク質の希釈によって生じるものなどの凝固障害、出血および/または輸液による線維素溶解の増大および血小板数の低下(たとえば、手術または外傷を受けた多回輸血された被験者のもの)によって引き起こされる症候群を含む(これらに限定されない)出血障害などの、いずれのVII因子応答性の症候群を治療するために使用してもよい。本発明に従ったVII因子またはVII

因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む薬学的組成物は、主に予防的および/または治療的な治療のための非経口投与が企図される。好ましくは、薬学的組成物は、非経口的、すなわち静脈内に、皮下に、または筋肉内に投与され；静脈内が最も好ましい。また、これらは、持続的またはパルス状の輸液によって投与されてもよい。

#### 【0152】

本発明に従った薬学的組成物または製剤は、単一の単位剤形に、またはパーツのキットに、いずれかに処方され、好ましくは薬学的に許容されるキャリアに、好ましくは水性キャリアまたは希釈液に溶解された、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む。簡単には、本発明に従って使用するために適した薬学的組成物は、VII因子もしくはVII因子関連ポリペプチド、またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチド、またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドと組み合わせたVII因子もしくはVII因子関連ポリペプチドを、好ましくは精製した形態で、適切なアジュバントおよび適切なキャリアまたは希釈液と混合して作成される。水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどの種々の水溶性担体を使用してもよい。また、本発明の標品は、傷害の部位に対してデリバリーまたはターゲティングするために、たとえばゲルの形態で、またはリポソーム標品としてなどの非水系のキャリアを使用して処方することもできる。リポソーム標品は、たとえば米国特許第4,837,028,4号、501,728号、および4,975,282号において一般に記載されている。本組成物は、従来によく知られた滅菌法技術によって殺菌されていてもよい。生じる水溶液は、使用のためにパックされ、または無菌条件下で濾過して凍結乾燥されていてもよく、凍結乾燥された標品は、投与の前に滅菌水溶液と混合される。

10

20

#### 【0153】

本組成物は、たとえば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、その他などの、pH調整して、かつ緩衝化した薬剤および/または緊張度を調整した薬剤を含む（これらに限定されるものではない）、薬剤的に許容される補助物質またはアジュバントをする含んでいてもよい。

#### 【0154】

製剤は、1つまたは複数の希釈液、乳化剤、保存剤、緩衝液、賦形剤、その他を更にも含んでもよく、液体、粉末、エマルジョン、徐放性、その他などの形態で提供されてもよい。この技術分野の当業者であれば、本発明の組成物を適切な方法で、およびRemington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に開示されたものなどの是認された実務に従って処方してもよい。したがって、静脈内輸液のための典型的な薬学的組成物は、250mlの無菌のリンゲル液および10mgの本標品を含むように作成することができるであろう。

30

#### 【0155】

本発明の標品を含む組成物は、予防的および/または治療的な治療のために投与することができる。治療的な適用において、本組成物は、すでに疾患に罹患している被検者に対して、疾患およびその合併症の臨床症状を治癒する、軽減する、または部分的に抑えるために十分な量で、上記の通りに投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療的に有効な量」として定義される。それぞれの目的のための有効な量は、疾患または傷害の重篤さ、並びに被検者の重量および一般的な状態に依存する。適切な用量の決定が、値からマトリックスを構築すること、およびマトリックスの異なる点を試験することによって、ルーチン試験を使用して達成されるであろうことが理解される。

40

#### 【0156】

本発明の標品の局所的デリバリー、たとえば局所的適用は、たとえば噴霧、灌流、二重バルーンカテーテル、ステント、血管グラフトまたはステントに組み込むこと、バルーンカテーテルを被覆するために使用されるヒドロゲル、またはその他のよくは確立された方法によって行ってもよい。いずれにしても、薬学的組成物は、症状を有効に治療するために十分な標品の量を提供すべきである。

#### 【0157】

50

これらの製剤中の、VII因子もしくはVII因子関連ポリペプチド、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチド、またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドと組み合わせたVII因子もしくはVII因子関連ポリペプチドの濃度は、広く変更させることができ、すなわち、約0.5重量%未満、通常少なくとも約1重量%以上から、15または20重量%程度であり、選択される特定の投与方法に従って、主に液体体積、粘性、その他によって選択される。注射または輸液、特に注射による投与が好ましい。したがって、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、VII因子もしくはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの両方を含む溶解された凍結乾燥粉末または液状製剤の1つの剤形のもの、またはVII因子もしくはVII因子関連ポリペプチドを含む溶解された凍結乾燥粉末または液状製剤の1つの剤形のものとTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む溶解された凍結乾燥粉末または液状製剤の1つの剤形のもののいずれかの標品などの静脈内投与に適した形態で調製される。

10

**【0158】**

VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの量、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの量は、共に、出血の発症を治療するために有効な量の凝集体を含むことが理解される。

**【0159】**

本発明の材料が、一般に重篤な疾病または傷害において、すなわち生命に脅威となる、または潜在的に生命に脅威となる状況において使用されことを考慮に入れておかなければならない。そのような場合、外来物質の極小化およびヒトにおけるVIIa因子の免疫原性およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの一般的な欠如の点からみて、治療医師によって、これらの組成物を実質的に過剰に投与することが可能であり、および望ましいと感じらるであろう。

20

**【0160】**

予防的適用において、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含む組成物は、疾病状態または傷害に感受性があるか、またはさもなければリスクのある被験者に投与されて、被験者自身の凝固能力を増強する。このような量は、「予防的に有効な用量」であると定義される。VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの量、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの量は、共に、出血の発症を治療するために有効な量の凝集体を含むことが理解される。

**【0161】**

本組成物の一回または複数回の投与は、治療者により選択される用量レベル及びパターンで実施される。本組成物は、日または週につき、1回または複数回で投与されてもよい。このような薬学的組成物の有効な量は、出血の発症に対して臨床的に有意な効果を提供する量である。このような量は、一つには治療される特定の症状、被験者の年齢、重量、および一般的な健康、並びに当業者に明らかなその他の因子に依存する。

30

**【0162】**

本発明の組成物は、一般に予想される出血の前に、または出血の開始時に、単一用量で投与される。しかし、好ましくは、与えられる用量および被験者の症状に依存して、2-4-6-12時間の間隔で繰り返し（多回投与において）与えられてもよい。

**【0163】**

慎重な処置に関連した治療のためには、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、典型的には処置を行う前の約24時間以内に、およびその後7日以上の間投与されるであろう。凝固剤としての投与は、本明細書に記載されているように種々の経路によることができる。

40

**【0164】**

本組成物は、適切な濃度のVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品の両方を含む単一の標品（単一の剤形）の形態であってもよい。また、本組成物は、単一の剤形に両方の凝固因子を含む単一の剤形において、または第1の単位剤形としてVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの標品を、第2の単位剤形としてTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの標品を含むパーツのキットの形態で供給さ

50

れてもよい。この場合、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、一方の後に他方が、好ましくは、互いに約15分以内、たとえば互いに10分以内、またはより好ましくは、好ましくは互いに5分以内、または、より好ましくは互いに2分以内に、投与され投与されるべきである。2つの単位剤型のいずれも、最初に投与することができる。

#### 【0165】

本キットは、少なくとも2つの別々の薬学的組成物を含む。本キットは、別々の瓶または別々の箔パッケージなどの、別々の組成物を含むための容器手段を含む。典型的には、本キットは、別々の成分の投与のための説明書を含むが、これに限定されない。別々の成分が好ましくは異なる剤形で、異なる投与間隔で投与されるときに、または個々の成分の組み合わせの滴定が処方する医師によって要求されているときに、本キット形態は特に有利である。

10

#### 【0166】

本発明に従って投与されるVII因子またはVII因子関連ポリペプチドの量、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの量は、約1:100~約100:1(w/w)の間で比を変化してもよい。したがって、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドに対するVII因子の比は、たとえば約1:100、または1:90、または1:80、または1:70、または1:60、または1:50の、または1:40、または1:30、または1:20、または1:10、または1:5、または1:2、または1:1、または2:1、または5:1、または10:1、または20:1、または30:1、または40:1、または50:1、または60:1、または70:1、または80:1、または90:1、または100:1; または、約1:90~約1:1の間、または、約11:80~約1:2の間、または、約1:70~約1:5の間、または、約1:60~約1:10の間、約1:50~約1:25の間、約1:40~約1:30の間、または約90:1~約1:1の間、または、約80:1~約2:1の間、または、約70:1~約5:1の間、または約60:1~約10:1の間、または約50:1~約25:1の間、または約40:1~約30:1の間であってもよい。

20

#### 【0167】

VII因子またはVII因子関連ポリペプチドの用量は、被検者の重量、症状、および症状の重篤さに依存して、負荷投与量または維持量として、70kgの被検者について約0.05mg~約500mg/日の野生型VII因子、たとえば約1mg~約200mg/日、またはたとえば約5mg~約175mg/日に対応する範囲で変動する。

30

#### 【0168】

TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの用量は、被検者の重量、症状、および症状の重篤さに依存して、負荷投与量または維持量として、70kgの被検者について約0.05mg~約500mg/日の野生型TAFI、たとえば約1mg~約200mg/日、またはたとえば約5mg~約175mg/日に対応する範囲で変動する。

#### 【0169】

VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせにより、インビトロにおける血餅堅固性アッセイ法および線維素溶解時間アッセイ法において相乗効果を示す。さらに、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドの組み合わせにより、安定なフィブリン凝塊の形成、半分血餅溶解時間の増大、血餅強度の増大、および線維素溶解に対する耐性の増大において相乗効果を示す。

40

#### 【0170】

本組成物は、適切な濃度のVII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む単一の標品の形態であってもよい。また、本組成物は、VII因子またはVII因子関連ポリペプチドを含む第1の単位剤形と、TAFIまたはTAFI関連ポリペプチドを含む第2の単位剤形とからなるキットの形態であってもよい。この場合、VII因子またはVII因子関連ポリペプチド、およびTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドは、好ましくは、互いに約1~2時間以内、たとえば、互いに30分以内、または好ましくは10分以内、またはより好ましくは互いに5分以内に、逐次投与されるべきである。2つの単位剤型のいずれ

50

れも、最初に投与することができる。

【0171】

本発明は、別々に投与されてもよい活性成分を組み合わせて治療することによる出血の発症の、または凝固治療の、防止または治療に関するもので、本発明は、キット形態の別々の薬学的組成物を組み合わせることにも関する。本キットは、少なくとも2つの別々の薬学的組成物を含む。本キットは、別々の瓶または別々の箔パッケージなどの別々の組成物を含むための容器手段を含む。典型的には、本キットは、別々の成分の投与のための説明書を含むが、これに限定されない。別々の成分が好ましくは異なる剤形で、異なる投与間隔で投与されるときに、または個々の成分の組み合わせの滴定が処方する医師によって要求されているときに、本キット形態は特に有利である。

10

【0172】

アッセイ法：

VIIa因子活性の試験：

VIIa因子活性を試験することにより、適切なVIIa因子変異体を選択するために適したアッセイ法は、単一の予備的なインビトロ試験として行うことができる：

インビトロ加水分解アッセイ法

天然の(野生型) VIIa因子およびVIIa因子変異体(両者とも、これ以降「VIIa因子」と称する)で比活性をアッセイしてもよい。また、これらは、平行して、直接これらの比活性を比較するためにアッセイしてもよい。アッセイ法は、マイクロタイタープレート(MaxiSorp、Nunc、Denmark)において行う。終濃度1mMの色素生産性基質D-Ile-Pro-Arg-p-ニトロアニリド(S-2288、Chromogenix、Sweden)を、VIIa因子(終濃度100nM)の0.1M NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、および1mg/mlのウシ血清アルブミンを含む50mMのHepes、pH7.4溶液に添加する。405nmの吸光度を、SpectraMax(商標)340プレートリーダー(Molecular Devices、USA)において連続的に測定する。20分のインキュベーションの間に発生した吸光度を、酵素を含んでいない空のウェルの吸光度を減算した後に、変異体および野生型のVIIa因子活性の間の比を算出するために使用する：

20

比 = (A<sub>405nm</sub> VIIa因子変異体) / (A<sub>405nm</sub> VIIa因子野生型)。

【0173】

その結果に基づいて、天然のVIIa因子に匹敵するか、それよりも高い活性を有するVIIa因子変異体を、たとえば変異体の活性および天然のVII因子(野生型FVII)の活性の間の比が、対1.0を超える周辺にある変異体)などを、同定してもよい。

30

【0174】

また、VIIa因子またはVIIa因子変異体の活性は、X因子などの生理学的な基質を、最適には100~1000nMの濃度で使用して測定してもよく、この場合、Xa因子の生成は、適切な色素生産性基質(例えば、S-2765)を添加した後に測定する。加えて、活性アッセイ法は、生理学的な温度の行ってもよい。

【0175】

インビトロ・タンパク質分解アッセイ法

天然の(野生型) VIIa因子およびVIIa因子変異体(両者とも、これ以降「VIIa因子」と称する)を、平行して、直接これらの比活性を比較するためにアッセイする。アッセイ法は、マイクロタイタープレート(MaxiSorp、Nunc、Denmark)において行う。VIIa因子(10nM)およびX因子(0.8μM)の0.1M NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、および1mg/mlのウシ血清アルブミンを含む50mMのHepes、pH7.4の100μlの溶液を15分間インキュベートする。次いで、0.1M NaCl、20mM EDTA、および1mg/mlのウシ血清アルブミンを含む50mMのHepes、pH7.4を50μl添加することにより、X因子の切断を停止する。生成したXa因子の量は、色素生産性基質Z-D-Arg-Gly-Arg-p-ニトロアニリド(S-2288、Chromogenix、Sweden)(終濃度0.5)を添加することによって測定する。405nmの吸光度を、SpectraMax(商標)340プレートリーダー(Molecular Devices、USA)において連続的に測定する。20分のインキュベーションの間に発生した吸光度を、酵素を含んでいない空のウェルの吸光度を減算した後に、変異体および野生型のVIIa因子活性の間の比を算出するために使用する：

40

50

比 = (A<sub>405nm</sub>VIIa因子変異体) / (A<sub>405nm</sub>VIIa因子野生型)。

【0176】

その結果に基づいて、天然のVIIa因子に匹敵するか、それよりも高い活性を有するVIIa因子変異体を、たとえば変異体の活性および天然のVII因子(野生型FVII)の活性の間の比が、対1.0を超える周辺にある変異体などを、同定してもよい。

【0177】

トロンピン生成アッセイ法：

VII因子もしくはVII因子関連ポリペプチド、またはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチドもしくはTAFIまたはTAFI関連ポリペプチド関連ポリペプチド(たとえば、変異体)がトロンピンを生成する能力は、全ての関連した凝固因子および生理的濃度の阻害剤および活性化された血小板を含むアッセイ法において測定することができる(J. Haematol. 99, 542-547の543ページに記載されているもの、これは本明細書に参照として援用される)。

10

【0178】

TAFI活性の試験：

TAFI活性を試験することにより、適切なTAFI変異体を選択するために適したアッセイ法は、たとえば、Boffaら、J. Biol. Chem. 273: 2127, 1998(「TAFIアッセイ法」)に記載されておりの、簡単なインビトロ試験として行うことができる。

【0179】

本発明は、以下の実施例によってさらに図示されるが、これは、保護の範囲を限定するものとして解釈されない。前記において、および以下の実施において、開示された特徴は、別々に、およびその任意の組み合わせの両方ともが、本発明のその多様な形態を理解するための材料である。

20

【実施例】

【0180】

実施例1

VIIa凝固因子およびTAFIを組み合わせることによって、止血性の血餅の安定度を改善する

方法：

血餅溶解アッセイ法：イノピン(Innovin)(Dade Behring, 2000倍希釈)、rFVIIa(Novo Nordisk A/S Bagsvaerd, Denmark、種々の濃度)、およびt-PA(American Diagnostica, 8nm)を含む緩衝液(20mMのHEPES、150mMのNaCl、5mMのCaCl<sub>2</sub>、pH7.4)で10倍に希釈した正常ヒト血漿を96-ウェルELISAプレートに添加して、650nmの濁度を室温において時間とともに測定した。示した場合には、精製されたヒトTAFI(Bajzarら、J. Biol. Chem. 270: 14477, 1995)を含めた。

30

【0181】

回転性スロンボエラストグラフィー(rotational thromboelastography: roTEG)：5nMのt-PAを添加した、クエン酸塩加正常ヒト血漿で測定を行い、1nMのFVIIa単独または30nMのTAFIと組合せの添加の効果を解析した。凝固は、イノピン(終濃度2000倍希釈、Dade Behring# 526945)およびカルシウム(終濃度15mM)の20mMのHEPES、150mMのNaCl、pH7.4緩衝液の添加によって開始した。

40

【0182】

結果：

血餅溶解アッセイ法：FVIIa添加により、血餅溶解時間(図1)の用量依存的な延長を生じる。この効果は、10nMのFVIIaにおいて最適であった。10nMのFVIIaの存在下において、TAFIを添加することにより、血餅溶解時間(図2)のさらなる延長を生じた。効果は、用量依存的であり、300ng/mlのTAFIにおいて最適であった。

【0183】

スロンボエラストグラフィー(thromboelastography)：最大血餅固さ(Maximal Clot Firmness: MCF)に対するFVIIaおよびTAFIの効果、並びにt-PAを介した溶解に対する血餅の耐性を解析するために、roTEG測定を利用した。FVIIa; TAFIの添加前に、MCFは25mmであ

50

り、半分の血餅溶解に必要とされる時間は、12.3分であった（図3）。TAFI（300nM）の添加では、MCFを半化しなかったが、半分の血餅溶解時間を20.5分に延長した（図3）。同様に、FVIIa（1nM）の添加により、t-PAを介した線維素溶解からの血餅の保護を生じ（半分の血餅溶解時間；16.7分）、MCFに対しては、全く効果がなかった（図3）。しかし、TAFIと共にFVIIa（1nM）を添加すると、半分の血餅溶解時間を27.2分に増大する、図3。

【0184】

結論：

これらの結果は、血漿にFVIIaおよびTAFIを添加することにより、血餅の機械強度およびt-PAを媒介した線維素溶解に対する耐性を改善することを示す。

【図面の簡単な説明】

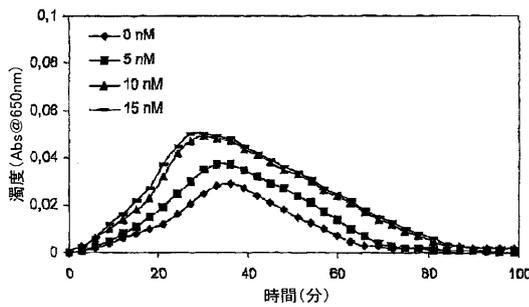
【0185】

【図1】 FVIIaの添加により、血餅溶解時間の用量依存的な延長が生じることを図示する。この効果は、10nMのFVIIaで最適であった。

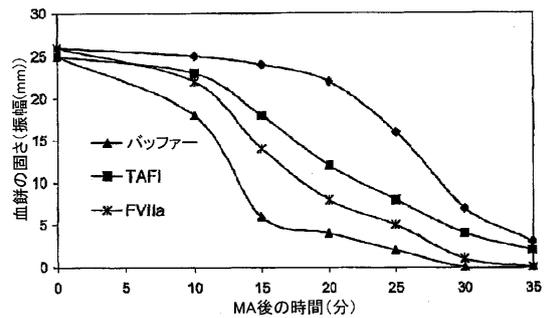
【図2】 10nmのFVIIaの存在下において、TAFIの添加により、血餅溶解時間のさらなる延長が生じたことを図示する。効果は、用量依存的であり、300nMのTAFIで最適であった。

【図3】 最大血餅固さ（Maximal Clot Firmness:MCF）に対するFVIIAおよびTAFIの効果、並びにt-PAを介した溶解に対する血餅の耐性を解析するために、roTEG測定を利用した。

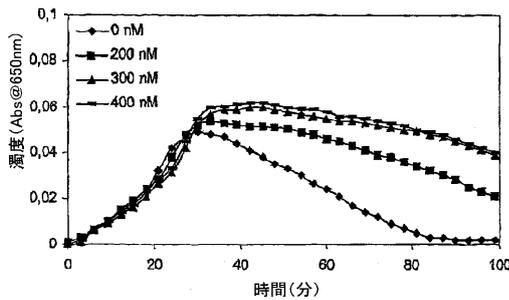
【図1】



【図3】



【図2】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DK 02/00734
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K38/36 A61K38/48 A61P7/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 83725 A (NOVO NORDISK AS) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document ---	1-53
Y	WO 98 58661 A (NOVONORDISK AS ;HEDNER ULLA (SE)) 30 December 1998 (1998-12-30) the whole document ---	1-53
Y	MOSNIER L O ET AL: "The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. GERMANY OCT 2001, vol. 86, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 1035-1039, XP002232343 ISSN: 0340-6245 the whole document ---	1-53
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date or another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 February 2003		17. 03. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-5016		Authorized officer  VIVECA NORÉN / ELY

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DK 02/00734

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 474 901 A (EATON DAN L ET AL) 12 December 1995 (1995-12-12) the whole document ---	1-53
A	US 5 866 122 A (EIBL JOHANN ET AL) 2 February 1999 (1999-02-02) the whole document -----	1-53

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK 02/00734**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 45-52  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: 1-53  
because they relate to parts of the international Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/DK 02/00734

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 45-52

Claims 45-52 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

-----

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-53

Present claims 1-53 relate to a combination of two extremely large groups of possible compounds designated "factor VII-related polypeptide" and "TAFI-related polypeptide" respectively.

Further claims 3 and 21 and claims 11 and 29 relate to an extremely large number of variants designated "factor VII amino acid variant" and "TAFI amino acid variant" respectively. In fact, the claims contain so many compounds and combinations of compounds that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which appear to be clear and concise, namely the combination of factor VII (human, recombinant and/or activated) and TAFI (human, recombinant and/or activated).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK 02/00734

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0183725	A	08-11-2001	AU 5462401	A 12-11-2001
			AU 5614801	A 12-11-2001
			WO 0183725	A1 08-11-2001
			WO 0182943	A2 08-11-2001
			EP 1282693	A1 12-02-2003
			EP 1280548	A2 05-02-2003
WO 9858661	A	30-12-1998	AU 7907398	A 04-01-1999
			WO 9858661	A1 30-12-1998
US 5474901	A	12-12-1995	US 5364934	A 15-11-1994
			US 5206161	A 27-04-1993
			US 5593674	A 14-01-1997
US 5866122	A	02-02-1999	AT 404673	B 25-01-1999
			AT 407116	B 27-12-2000
			AT 408612	B 25-01-2002
			AT 408947	B 25-04-2002
			AT 17797	A 15-09-2001
			AT 51896	A 15-06-1998
			AU 725442	B2 12-10-2000
			AU 1645197	A 25-09-1997
			CA 2200394	A1 20-09-1997
			CZ 9700819	A3 15-10-1997
			EP 0796623	A2 24-09-1997
			HU 9700603	A2 28-06-1999
			JP 10045620	A 17-02-1998
			US 6039945	A 21-03-2000
			US 6099837	A 08-08-2000
			US 6165974	A 26-12-2000
US 6224862	B1 01-05-2001			
AT 157396	A 15-05-2000			
AT 167396	A 15-06-2001			

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ロジクジアエル、ラスムス

デンマーク国、ディーケー - 2 8 2 0 ジェントフテ、フォルクエベイ 3 0 エー  
Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 DC08 DC14 MA02 MA66 NA05 NA14 ZA531 ZA532  
ZC751