



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103505728 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201310388759. 7

A61K 45/00(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 05. 26

A61P 25/00(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/685, 289 2005. 05. 26 US

(62) 分案原申请数据

200680026992. 9 2006. 05. 26

(83) 生物保藏信息

ATCC PTA-6230 2004. 09. 21

(71) 申请人 科罗拉多大学评议会法人机构

地址 美国科罗拉多州

申请人 南卡罗来纳州医科大学研究发展基金会

(72) 发明人 V·M·霍勒斯 J·M·瑟曼

S·汤姆林森 P·F·斯塔赫尔

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书3页 说明书34页

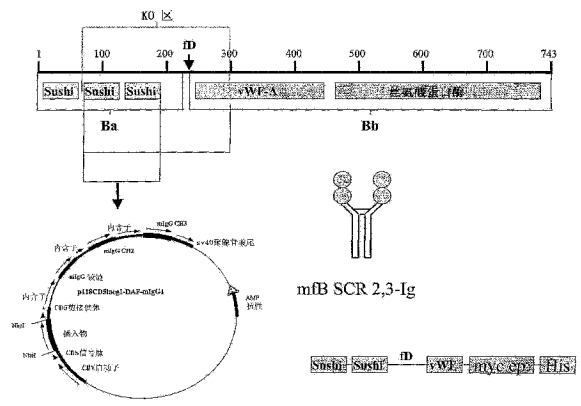
序列表15页 附图15页

(54) 发明名称

用于治疗外伤性脑损伤、脊髓损伤及相关病症的补体旁路抑制

(57) 摘要

本发明所公开的是使用选择性抑制补体旁路的试剂和组合物来抑制或治疗由外伤性脑损伤(TBI)、脊髓损伤(SCI)或相关病症导致的生理损害。优选的用于抑制由TBI或SCI导致的损害的试剂包括那些抑制因子B的试剂,抗因子B抗体代表了一种特别优选的试剂。



1. 一种抗体或其抗原结合片段在制备在遭受外伤性脑损伤(TBI)的动物体内减少或预防由补体激活导致的神经损伤或用于加强动物从 TBI 恢复的药物中的用途,所述抗体或其抗原结合片段选择性抑制所述动物体内因子 B 的活性。

2. 一种抗体或其抗原结合片段在制备在遭受脊髓损伤(SCI)的动物体内减少或预防由补体激活导致的神经损伤或用于加强动物从 SCI 恢复的药物中的用途,所述抗体或其抗原结合片段选择性抑制所述动物体内因子 B 的活性。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B 的第三短同源重复序列(SCR)结构域,其中所述抗体阻止 C3bBb 复合物的形成。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段结合因子 B 并阻止或抑制因子 D 切割因子 B。

5. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述抗体或抗原结合片段结合人因子 B 的第三短同源重复序列(SCR)结构域。

6. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B 的第三 SCR 结构域的表位,所述表位选自:

a) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位,所述部分包括从约 Tyr139 位至约 Ser185 位或其非人因子 B 序列中的等效位置;

b) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位,所述部分包括从约 Tyr139 位至约 Ser141 位或其非人因子 B 序列中的等效位置;

c) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位,所述部分包括从约 Glu182 位至约 Ser185 位或其非人因子 B 序列中的等效位置;和

d) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位,所述部分包括任何一个或多个下列位置或它们在非人因子 B 序列中的等效位置: Tyr139、Cys140、Ser141、Glu182、Gly184 或 Ser185。

7. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B (SEQ ID NO:2) 的第三 SCR 结构域的表位,所述表位包括一个或多个下列氨基酸位置: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。

8. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B (SEQ ID NO:2) 的第三 SCR 结构域的表位,所述表位包括下列氨基酸位置: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。

9. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B (SEQ ID NO:2) 的第三 SCR 结构域的表位,所述表位由下列氨基酸位置组成: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。

10. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B 第三 SCR 结构域的一部分的三维结构内的非线性表位,其中所述部分由至少 SEQ ID NO:2 的 Ala137-Ser192 的氨基酸位置所限定。

11. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合来自多个哺乳动物物种的因子 B 并阻止 C3bBb 复合物的形成。

12. 根据权利要求 5 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合来自至少人和动物的因子 B,所述动物选自非人灵长类、小鼠、大鼠、猪、马和兔。

13. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗体为非补体激活的同种型或亚类。
14. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗体为单克隆抗体。
15. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗原结合片段为 Fab 片段。
16. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗体为人源化抗体。
17. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗体为双特异性抗体。
18. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗体为单价抗体。
19. 根据权利要求 1-12 任一项的用途,其中所述抗体为单克隆抗体 1379 (由 ATCC 保藏号 PTA-6230 的菌株产生)。
20. 根据权利要求 1 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段为静脉内给药或被给予到所述动物的脑的。
21. 根据权利要求 2 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段为静脉内给药或被给予到所述动物的脊髓或脊髓的硬膜外隙的。
22. 根据权利要求 1-21 任一项的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是被以一份量给予到所述遭受 TBI 或 SCI 的动物,与未给予所述抗体或其抗原结合片段的情况相比,所述量能有效在动物体内显著减少由补体激活导致的神经损伤。
23. 根据权利要求 1 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是以有效维持 70-80mmHg 以上的脑灌注压(CPP)的量给予的。
24. 根据权利要求 1 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是以有效降低颅内压(ICP)的量给予的。
25. 根据权利要求 2 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是以有效减轻脊髓内肿胀的量给予的。
26. 根据权利要求 1-25 任一项的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是在可药用载体中给予的。
27. 根据权利要求 26 的用途,其中所述可药用载体为能够穿过血脑屏障的化合物或组合物。
28. 根据权利要求 26 的用途,其中所述可药用载体为可注射的赋形剂。
29. 根据权利要求 1 的用途,其中所述药物还包括另一种用于治疗 TBI 的症状的化合物,所述症状选自体格缺陷、认知障碍和心理社会-行为-情绪障碍。
30. 根据权利要求 29 的用途,其中所述化合物选自渗透性药物、镇静药、镇痛药、肌肉松弛药和巴比妥酸盐。
31. 根据权利要求 2 的用途,其中所述药物还包括一种类固醇。
32. 根据权利要求 1-31 任一项的用途,其中所述动物为哺乳动物。
33. 根据权利要求 1-31 任一项的用途,其中所述动物为人。
34. 一种抗体或其抗原结合片段在制备在遭受 TBI 的动物体内减少或预防由补体激活导致的神经损伤的药物中的用途,所述抗体或其抗原结合片段通过结合或阻断因子 B 的第三短同源重复序列(SCR)结构域来抑制因子 B。
35. 一种抗体或其抗原结合片段在制备在遭受 SCI 动物的体内减少或预防由补体激活导致的神经损伤的药物中的用途,所述抗体或其抗原结合片段通过结合或阻断因子 B 的第三短同源重复序列(SCR)结构域来抑制因子 B。

36. 根据权利要求 34 或 35 的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B。
37. 一种组合物,包括:
- a) 一种选择性地抑制因子 B 的生物活性的分离的抗体或其抗原结合片段;和
 - b) 一种用于治疗外伤性脑损伤(TBI)的症状的试剂。
38. 一种组合物,包括:
- a) 一种选择性地抑制因子 B 的生物活性的分离的抗体或其抗原结合片段;和
 - b) 一种用于治疗脊髓损伤(SCI)的症状的试剂。
39. 根据权利要求 37 或 38 的组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段结合因子 B 中的第三短同源重复序列(SCR)结构域,并抑制或阻止 C3bBb 复合物的形成。
40. 根据权利要求 37-39 任一项的组合物,其中所述抗体为单克隆抗体 1379。
41. 根据权利要求 37 的组合物,其中所述试剂为一种用于治疗 TBI 的症状的化合物,所述 TBI 症状选自:体格缺陷、认知障碍和心理社会-行为-情绪障碍。
42. 根据权利要求 37 的组合物,其中所述试剂选自渗透性药物、镇静药、镇痛药、肌肉松弛药和巴比妥酸盐。
43. 根据权利要求 38 的组合物,其中所述试剂为类固醇。
44. 一种选择性结合因子 B 的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗外伤性脑损伤(TBI)的药物组合物中的用途。
45. 一种选择性结合因子 B 的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗脊髓损伤(SCI)的药物组合物中的用途。
46. 根据权利要求 37-43 任一项的组合物,其中所述症状包括神经损伤。

用于治疗外伤性脑损伤、脊髓损伤及相关病症的补体旁路抑制

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 5 月 26 日,申请号为 200680026992.9,发明名称为“用于治疗外伤性脑损伤、脊髓损伤及相关病症的补体旁路抑制”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明主要涉及通过选择性抑制补体旁路——在一个具体的实施方案中通过抑制因子 B——来治疗由外伤性脑损伤、脊髓损伤或相关病症导致的生理损害。

背景技术

[0003] 补体激活主要通过三种途径发生:所谓的经典途径、凝集素途径和旁路途径。旁路激活所涉及的关键蛋白为因子 B (fB) 和因子 D (fD)。这些蛋白共同作用来启动和 / 或放大 C3 的激活,然后这会导致许多炎性事件的启动。第三种蛋白即备解素会稳定 C3 和因子 B 的复合物但是并不一定是旁路途径起作用时所需的。因子 B 也有助于溶解免疫复合物,已有报道称因子 B 可以作为 B 细胞生长因子起作用并且能激活单核细胞 (Takahashi, 1980; Hall, 1982; Peters, 1988)。已经生成了因子 B 缺陷型小鼠 (fB^{-/-} 小鼠),并且在这些小鼠体内响应于 T 细胞依赖性抗原的 IgG1 抗体和对内毒素性休克的敏感性似乎都是正常的 (Matsumoto, 1997)。

[0004] 补体旁路通常是由细菌、寄生虫、病毒或真菌启动,但是已有报道称 IgA Ab 和某些 Ig L 链会激活这一途径。当循环的因子 B 与激活的 C3 (C3b 或 C3H20) 结合时,旁路途径的激活就会被启动。然后该复合物会被循环的因子 D 切割产生具有酶活性的片段 C3bBb。C3bBb 会切割 C3 生成 C3b,这会导致炎症并且也会进一步放大所述的激活过程,形成正反馈环。需要全部两种组分(因子 B 和因子 D)来使得所述旁路途径能够被激活。

[0005] 最近的研究已经证明所述补体旁路在几种动物疾病模型的发病机理中起到重要作用。例如,在缺血再灌注损伤(I/R)后的肾脏中,补体激活几乎仅由旁路途径介导 (Thurman et al., 2003, J Immunol 170:1517-1523),并且所述旁路途径在性关节炎的发展中起到重要作用。可能最令人吃惊的是,已经证明旁路途径有缺陷的小鼠在狼疮肾炎的 MRL/lpr 模型中不会患肾炎 (Watanabe et al., 2000, J Immunol 164:786-794),并且不会引起抗磷脂介导的流产 (Girardi et al., 2003, J Clin Invest 112:1644-1654),所述模型传统上被认为是由经典补体途径介导的。此外, Nataf 等人已经证明,在 C3 (-/-) 和因子 B (-/-) 两种小鼠的实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 模型中,与它们的野生型同窝小鼠相比,几乎没有巨噬细胞和 T 细胞的实质浸润,并且诱导了 EAE 的 C3 (-/-) 和因子 B (-/-) 小鼠的中枢神经系统 (CNS) 不会有脱髓鞘作用 (Nataf et al., 2000, J. Immunol. 165:5867-5873)。对 EAE 模型的 C4 (-/-) 小鼠的自身免疫病理的后续研究表明,与具有完全完整补体系统的对照相比, C4 基因的缺失不会明显地改变发作的时间或髓磷脂少突胶质细胞诱导的 EAE 的严重程度和进展速度,说明鼠补体对脱髓鞘病发病作用是通过旁路途径实现的 (Boos et al., 2005, Glia 49:158-160)。

[0006] 外伤性脑损伤(本文也称为 TBI)是一种对个体健康非常有害的目前尚没有有效疗法的病症。已经证明 TBI 后的脑损害的发展涉及补体激活(Bellander et al., 2001, J. Neurotrauma18:1295-1311;Kaczorowski et al., 1995, J. Cereb. Blood Flow Metab. 15:860-864;Keeling et al., 2000, J. Neuroimmunol. 105:20-30;Schmidt et al., 2004, Eur. J. Trauma30:135-149;Nataf et al., 1999, Trends Neurosci22:397-402;Stahel et al., 1998, Brain Res. Rev. 27:243-256;Stahel et al., 2001, J. Neurotrauma18:773-781;Van Beek et al., 2003, Ann NY Acad Sci992:56-71;Rancan et al., 2003, J. Cereb. Blood Flow&Metab. 23:1070-1074)。但是,这些研究都集中于补体级联作用的某一点,此时激活补体的全部三种途径都集中在这一点,例如在 C3 (例如,参见 Rancan et al., 2003, *ibid.*)。因此,在本发明之前,还没有报道显示补体途径中是否有一种会由于 TBI 而被优先地或排他地激活,或者为发展 TBI 所需。

[0007] 在对头部损伤患者的治疗中,近期目标是通过快速矫正低血压、低氧血、高碳酸血和低血糖症来防止继发性脑损害。在对头部创伤患者的早期治疗中,重点是维持足够的脑灌注压(CPP),它应该在 70-80mmHg 以上。不同的治疗方法的目标都在于降低颅内压(ICP)以保持足够的 CPP。治疗方式有:通过手术清除颅内血肿来减少大面积损伤、用渗透性药物(例如甘露醇)减轻脑肿胀和通过脑室内导管来治疗性排出脑脊液(CSF)。在最初时患有严重 TBI 的患者被转移到重症监护病房(ICU)中并且按标准方案进行治疗。ICU 治疗的目标包括:实现并维持足够的气体交换和循环稳定性、预防低氧血和高碳酸血、定期重复进行计算机控制断层摄影术(CT)扫描以检测延缓的继发性颅内病理状态、深度镇静和镇痛以避免应激和疼痛、实现并维持最适的 CPP (>70mmHg)和脑氧平衡、避免体温过高(<38℃)、预防高血糖症和低钠血症、无常规进行的头部抬高(head elevation)、预防应激性溃疡并维持肠粘膜完整性,以及预防并发因素(例如肺炎或脑膜炎)。若 ICP 升高(>15mmHg, >5 分钟),可以通过如下方式来对患者进行治疗:(1)加深镇静、镇痛和肌肉松弛的程度;(2)通过脑室内导管来排出 CSF;(3)适度增加通气(在某些情况下);(4)渗透疗法;(5)适度降温(±34℃)和(6)巴比妥酸盐昏迷。

[0008] 脊髓损伤(本文也称为 SCI)也是一种对个体健康非常有害的目前尚没有有效疗法的中枢神经系统病症。已经证明 SCI 后损害的发展涉及补体激活(Anderson et al., 2004, J. Neurotrauma21(12):1831-46;Reynolds et al., 2004, Ann N Y Acad Sci. 1035:165-78;Rebhun et al., 1991, Ann Allergy66(4):335-8)。但是与 TBI 一样,这些研究都集中于补体级联作用的某一点,此时激活补体的全部三种途径都集中在这一点;或是提出所有的补体途径在 SCI 后有作用。因此,在本发明之前,还没有报道显示补体途径中是否有一种会由于 SCI 而被优先地或排他地激活,或者为发展 SCI 所需。

[0009] SCI 通常被定义为会导致功能(例如运动和感觉)丧失的脊髓损害。损害的常见原因是外伤(例如交通事故、枪击、跌倒等)或疾病(脊髓灰质炎、脊柱裂、弗里德赖希(氏)共济失调(Friedreich's Ataxia)等)。不必切断脊髓也可出现功能丧失。事实上,在大多数患有 SCI 的个体中,脊髓是完整的,但是对其的损害会导致功能丧失。除了感觉丧失或运动功能丧失,患有 SCI 的个体也可能会经历肠和膀胱功能障碍、性功能障碍和生育功能障碍、不能有效调节血压,体温控制减弱、不能在损伤位置以下出汗以及慢性疼痛。较高位的损伤(C-1、C-2)会导致包括呼吸能力在内的许多非自主功能的丧失,被迫使用呼吸辅助装置,例

如机械呼吸机或膈肌起搏器。

[0010] 目前尚无法治愈 SCI。在对 SCI 患者的治疗中,近期目标集中于在损伤发生后尽可能快的降低损害。类固醇类药物例如甲泼尼龙会减轻肿胀,肿胀是损伤时继发性损害的主要诱因。对于脊髓损伤有几种短期治疗方法。首先,将受损脊髓区的脊柱固定以防止对脊髓的进一步伤害(例如,使用头环、石膏、支具和固定带)。为了减轻由损伤导致的脊髓肿胀,通常在损伤后的最初 24 个小时内进行类固醇药物治疗,但是更典型的方式是对那些有神经功能缺损的患者进行类固醇药物治疗,并且启动治疗的时间窗是在创伤后不到 8 小时内(Bracken, 2001, Spine26 (24S):S47-S54)。根据可能产生的并发症,通常需要其他的药物治疗。由于对脊髓的外伤性损伤通常包括对脊柱的骨和韧带的损伤,所以可以进行外科手术。一些手术的目的是移开压在脊髓上或压入脊髓的骨(减压),或者是当椎骨或韧带受到损害时,稳定或复位脊髓损伤区域的脊柱。可以将金属杆或支架或螺钉与正常的椎骨连接起来以防止骨折的椎骨移动,并使用骨移植物或通过类似方法使椎骨“融合”起来。使用负重和滑轮(即牵引)也可以帮助脊柱复位。

[0011] 尽管有用于治疗 TBI 患者的方案,但是 TBI 治疗的潜在并发症可能包括:脑血管痉挛或心血管抑制、肝毒性、免疫抑制,和肺部感染的发病率升高。此外,尽管用于 SCI 的疗法可以适当降低生理损害,但是许多方案主要是用于帮助减少进一步损害的可能性并稳定患者。没有一种方案被证明能完全令人满意地抑制由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的发展。因此,本领域中仍旧需要具有更小的毒性并且对由 TBI 或 SCI 导致的损害的深层原因更加特异的治疗方法和试剂。

发明内容

[0012] 本发明的一个实施方案涉及一种用于在动物体内减少或预防由外伤性脑损伤(TBI)导致的生理损害的至少一种症状或用于加强动物从 TBI 恢复的方法。所述方法包括选择性抑制遭受 TBI 的动物体内的补体旁路。一方面,所述症状选自脑血管痉挛、心血管抑制、肝毒性、免疫抑制和 / 或肺部感染。另一方面,所述症状选自低血压、低氧血症、高碳酸血症和 / 或低血糖症。

[0013] 本发明的另一个实施方案涉及一种用于在动物体内减少或预防由脊髓损伤(SCI)导致的生理损害的至少一种症状或用于加强动物从 SCI 恢复的方法。所述方法包括选择性抑制遭受 SCI 的动物体内的补体旁路。一方面,所述症状为脊髓肿胀。

[0014] 本发明的又一个实施方案涉及一种选择性抑制补体旁路的试剂用于治疗外伤性脑损伤(TBI)的药物组合物中的用途。

[0015] 本发明的另一个实施方案涉及一种选择性抑制补体旁路的试剂用于治疗脊髓损伤(SCI)的药物组合物中的用途。

[0016] 在上述任一种方法或用途中,所述抑制步骤可包括给予所述动物一种选择性抑制补体旁路中蛋白质表达或蛋白质活性的试剂。所述补体旁路中的蛋白质选自因子 B、因子 D 和 / 或备解素。这类试剂包括但不限于所述补体旁路中蛋白质表达的抑制剂、所述补体旁路中蛋白质生物活性的抑制剂和 / 或所述补体旁路中蛋白质的拮抗剂。

[0017] 一方面,在上述任一种方法或用途中所用的试剂为抗体、抗体的抗原结合片段、或抗原结合多肽,它们选择性结合并抑制所述补体旁路中的所述蛋白质。一方面,所述抗体或

其抗原结合片段选择性结合因子 B 的第三短同源重复序列 (SCR) 结构域, 其中所述抗体阻止了 C3bBb 复合物的形成。一方面, 所述抗体或其抗原结合片段结合因子 B 并阻止或抑制因子 D 切割因子 B。一方面, 所述抗体或抗原结合片段结合人因子 B 的第三短同源重复序列 (SCR) 结构域。另一方面, 所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B 的第三 SCR 结构域的表位, 所述表位选自: (a) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位, 所述部分包括从约 Tyr139 位至约 Ser185 位或其非人因子 B 序列中的等效位置; (b) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位, 所述部分包括从约 Tyr139 位至约 Ser141 位或其非人因子 B 序列中的等效位置; (c) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位, 所述部分包括从约 Glu182 位至约 Ser185 位或其非人因子 B 序列中的等效位置; 和 / 或 (d) 包括至少一部分的人因子 B (SEQ ID NO:2) 的因子 B 的表位, 所述部分包括任何一个或多个下列位置或它们在非人因子 B 序列中的等效位置: Tyr139、Cys140、Ser141、Glu182、Gly184 或 Ser185。一方面, 所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B (SEQ ID NO:2) 的第三 SCR 结构域的表位, 所述表位包括一个或多个下列氨基酸位置或它们在非人因子 B 序列中的等效位置: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。另一方面, 所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B (SEQ ID NO:2) 的第三 SCR 结构域的表位, 所述表位包括或由下列氨基酸位置或它们在非人因子 B 序列中的等效位置组成: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。又一方面, 所述抗体或其抗原结合片段选择性结合因子 B 第三 SCR 结构域的一部分的三维结构内的非线性表位, 其中所述部分由至少 SEQ ID NO:2 的 Ala137-Ser192 的氨基酸位置或非人因子 B 序列中的等效位置所限定。又一方面, 所述抗体或其抗原结合片段选择性结合来自多个哺乳动物物种的因子 B 并阻止 C3bBb 复合物的形成。一方面, 所述抗体或其抗原结合片段选择性结合来自人和动物的因子 B, 所述动物选自非人灵长类、小鼠、大鼠、猪、马和兔。对于任一种上述抗体来说, 所述抗体包括但不限于非补体激活的同种型或亚类的抗体、单克隆抗体、人源化抗体、双特异性抗体和 / 或单价抗体。一方面, 所述抗原结合片段为 Fab 片段。在本发明一个优选的方面中, 所述抗体为单克隆抗体 1379 (由 ATCC 保藏号 PTA-6230 的菌株产生) 或其抗原结合片段。

[0018] 在涉及 TBI 的方法和用途中, 在一个优选的实施方案中, 所述试剂为静脉内给药或被给予到动物的脑。在涉及 SCI 的方法和用途中, 在一个优选的实施方案中, 所述试剂为静脉内给药或被给予到动物的脊髓或脊髓的硬膜外隙。优选地, 所述试剂被以某一个量给予到动物, 与未给予所述试剂的情况相比, 所述量能有效在动物体内显著减少由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的至少一种症状。对 TBI 来说, 一方面, 所述试剂以有效维持 70-80mmHg 以上的脑灌注压 (CPP) 的量给予, 或以有效降低颅内压 (ICP) 的量给予。对 SCI 来说, 一方面, 所述试剂以有效量给予以减轻脊髓内肿胀。一方面, 所述试剂是在可药用载体中给予的, 所述可药用载体包括但不限于能够穿过血脑屏障的化合物或组合物和 / 或可注射的赋形剂。

[0019] 在涉及 TBI 的上述任一种方法或用途的一个方面中, 进一步给予所述动物另一种用于治疗 TBI 的症状的化合物, 所述症状选自体格缺陷 (physical impairment)、认知障碍和心理社会 - 行为 - 情绪障碍。这类化合物包括但不限于渗透性药物、镇静药、镇痛药、肌肉松弛药和 / 或巴比妥酸盐。

[0020] 在涉及 SCI 的上述任一种方法或用途的一个方面中, 进一步给予所述动物一种类

固醇。

[0021] 在涉及 TBI 的上述任一种方法或用途的一个方面中,所述方法进一步包括通过一种方案来治疗动物的 TBI,所述方案选自:通过手术清除颅内血肿来减少大面积损伤;用渗透性药物减轻脑肿胀;通过脑室内导管来治疗性地排出脑脊液(CSF);计算机控制断层摄影术(CT)扫描;镇静;镇痛;肌肉松弛;适度增加通气;适度降温和/或巴比妥酸盐昏迷。

[0022] 在涉及 SCI 的上述任一种方法或用途的一个方面中,所述方法进一步包括通过一种方案来治疗动物的 SCI,所述方案选自:给予类固醇、脊柱固定、减压手术、手术稳定椎骨、手术复位椎骨和/或牵引。

[0023] 在上述任一种方法和用途中,所述动物优选为哺乳动物,包括但不限于人。

[0024] 本发明的进一步的实施方案涉及(1)一种用于在遭受外伤性脑损伤(TBI)的动物体内减少或预防由 TBI 导致的生理损害的至少一种症状的方法,或(2)一种用于在遭受脊髓损伤(SCI)的动物体内减少或预防由 SCI 导致的生理损害的至少一种症状的方法,每种方法均包括给予所述动物一种试剂,所述试剂通过结合或阻断因子 B 的第三短同源重复序列(SCR)结构域来抑制因子 B。在这些实施方案的一个优选的方面中,所述试剂为选择性结合因子 B 的抗体或其抗原结合片段。

[0025] 本发明的另一个实施方案涉及一种组合物,包括:(a)一种选自分离的抗体、其抗原结合片段、和/或抗原结合多肽的第一试剂,其中所述第一试剂选择性地抑制补体旁路中蛋白质的表达或生物活性;和(b)一种用于治疗外伤性脑损伤(TBI)的症状的第二试剂。一方面,所述第二试剂为一种用于治疗 TBI 的症状的化合物,所述 TBI 的症状选自:体格缺陷、认知障碍和/或心理社会-行为-情绪障碍。另一方面,所述第二试剂选自渗透性药物、镇静药、镇痛药、肌肉松弛药和巴比妥酸盐。

[0026] 本发明的又一个实施方案涉及一种组合物,包括:(a)一种选自分离的抗体、其抗原结合片段、和/或抗原结合多肽的第一试剂,其中所述第一试剂选择性地抑制补体旁路中蛋白质的表达或生物活性;和(b)一种用于治疗脊髓损伤(SCI)的症状的第二试剂。一方面,所述第二试剂为类固醇。

[0027] 在上述两种组合物的任一种中,所述第一试剂可以包括但不限于抑制选自因子 B、因子 D 和/或备解素的蛋白质的表达或生物活性的试剂。一方面,所述第一试剂结合因子 B 中的第三短同源重复序列(SCR)结构域,并抑制或阻止 C3bBb 复合物的形成。另一方面,所述第一试剂为抗体或其抗原结合片段。在一个优选的方面中,所述抗体为单克隆抗体 1379。用于本发明的方法或用途的上述任一种试剂可用于本发明的组合物中。

附图说明

[0028] 图 1 为示出了构建因子 B-Ig 融合蛋白的示意图。

[0029] 图 2A 为线形图,示出了当向含 10 μ l 血清的反应体系中加入 3 μ g 抗因子 B 时,用酵母聚糖测定法测得抗因子 B 完全抑制了补体旁路。

[0030] 图 2B 为线形图,示出了当向 10 μ l 人血清加入 6 μ g 抗体时,用兔红细胞裂解测定法测得抗因子 B 完全抑制了补体旁路。

[0031] 图 3 为示出了给予小鼠抗因子 B 来抑制补体旁路的线形图。

[0032] 图 4 为示出了人因子 B 表面上 mAb1379 的表位定位模型的示意图。

[0033] 图 5 为示出了结合了因子 B 的 mAb1379 (一个 Fab 片段) 的模式化复合物的示意图, 所述 Fab 的抗原结合侧已经被建模为覆盖整个定位表位区。

[0034] 图 6 为示出了 TBI 后 Crry-Ig 抑制神经障碍的线形图。

[0035] 图 7 为示出了 TBI 后 Crry-Ig 抑制体重减轻的线形图。

[0036] 图 8 为示出了给予抗因子 B (mAb1379) 来减轻 TBI 相关脑损害的柱状图。

[0037] 图 9 为示出了给予抗因子 B (mAb1379) 促进脊髓损伤恢复的线形图。

[0038] 图 10 为柱状图, 示出了脑损伤的 C57BL/6(fB+/+) 小鼠血清中 C5a 水平是升高的, 而在缺少功能性补体旁路的因子 B 基因缺陷 (fB-/-) 型小鼠体内 C5a 水平却显著降低。

[0039] 图 11 为由蛋白质印迹分析测定得的蛋白质印迹的数码照片, 示出了外伤性脑损伤 (TBI) 后, fB-/- 型小鼠的血清和脑内抗凋亡介质 Bcl-2 上调。

[0040] 图 12 为数码照片, 示出了闭合性头部外伤后 4 小时, 因子 B 基因缺陷型小鼠的受伤半球中神经元细胞死亡减轻情况。

[0041] 图 13 为数码照片, 示出了闭合性头部外伤后 24 小时, 因子 B 基因缺陷型小鼠的受伤半球中神经元细胞死亡减轻情况。

[0042] 图 14 为数码照片, 示出了闭合性头部外伤后 7 天, 因子 B 基因缺陷型小鼠的受伤半球中神经元细胞死亡减轻情况。

具体实施方式

[0043] 本发明主要涉及发明人的发现, 所述发现是指通过旁路途径激活补体级联是外伤性脑损伤 (TBI) 诱导生理损害所必需的, 以及对补体旁路的抑制足以减轻由 TBI 或脊髓损伤 (SCI) 导致的损害 (或促进恢复)。更具体地说, 本发明的发明人在本说明书中公开了以下发现: 在 TBI 的实验模型中, 抑制补体旁路会抑制生理损害 (例如脑损伤); 并且在 SCI 的实验模型中, 抑制补体旁路也会抑制损害 (通过增强的恢复程度来测定)。因此, 本发明涉及化合物、组合物, 以及这些化合物或组合物在通过选择性抑制补体旁路来预防和 / 或治疗 TBI、SCI 或其他神经元损害或脑损害的方法中的用途。

[0044] 首先, 本发明的发明人首次证明了补体激活的旁路途径在促成总体程度的创伤后补体激活和脑损伤后的继发性神经元细胞死亡中具有主要作用。此外, 发明人已经证明通过抑制因子 B 来特异性抑制补体旁路, 以及通过使用 C3 补体转化酶抑制剂 Crry-Ig 对 C3 的抑制作用来总体抑制补体途径, 均能抑制 TBI 相关的损害。现认为本发明首次公开了 TBI 相关的生理损害和效应能够通过特异性和选择性地抑制补体旁路系统来抑制。

[0045] 其次, 本发明的发明人已经证明了通过抑制因子 B 来抑制补体旁路可抑制 SCI 相关的损害。现认为本发明首次公开了 SCI 相关的生理损害和效应能够通过特异性和选择性地抑制补体旁路系统来抑制。

[0046] 将补体旁路中的因子 B 和其他蛋白质 (例如因子 D 或备解素) 确定为特异性治疗靶标, 这提供了可用于通过选择性抑制补体旁路来抑制由 TBI 或 SCI 导致的生理损害或效应的合理策略和先导化合物。

[0047] 已经开发了几种抑制剂来在激活的各个阶段抑制补体系统 (Holers, V. M. 2003, Clin Immunol 107:140-151), 但是补体旁路的特异性抑制剂还未被广泛报道。与已有的补体级联抑制剂相比, 特异性抑制旁路途径具有几种优势。首先, 由于本发明的发明

人已经发现由 TBI 或 SCI 导致的生理损害主要是由补体激活的旁路途径介导的,所以该途径的特异性抑制剂与广谱补体抑制剂(pan-complement inhibitor)一样有效,并且应该几乎没有免疫抑制副作用。此外, C4^{-/-} 小鼠(缺少经典补体途径、旁路途径和凝集素补体途径中通用的 C4 补体组分的小鼠)而非 fB^{-/-} (因子 B 缺陷)小鼠,似乎对全体的实验性细菌感染更加敏感,这表明通过保持经典途径的完整性,旁路途径的抑制剂使得严重感染的风险更小。虽然仅报导过一名患有因子 B 先天缺陷症的人类患者(Densen et al., 1996, Mol Immunol 33:68 (Abstract 270)),但是针对基因打靶的因子 B 缺陷型小鼠(fB^{-/-})的研究尚没有证明该因子具有免疫调节作用(Densen et al., supra; Matsumoto et al., 1997, Proc Natl Acad Sci U S A 94:8720-8725)。相比而言,经典途径组分先天缺陷的患者感染的风险似乎会增加(最常见的葡萄球菌(*Staphylococcus*)和链球菌(*Streptococcus*))。经典途径组分或 C3 (所有补体途径所共有的)的抑制也可能与自身免疫相关(Figueroa and Densen, 1991, Clin Microbiol Rev 4:359-395),这可能解释了为什么因子 B 缺陷能使得 MRL/lpr 小鼠不会患肾小球肾炎,而 C3 缺陷却无此作用(Watanabe et al, supra)。选择性抑制旁路途径会防止生成 C3a 受体以及补体受体 1-4 和 C5a 的 C3 来源配体。事实上,由于尚不能很好地对激活过程中产生的因子 B 的 Ba 或 Bb 激活产物的受体进行表征,阻断旁路途径的效果可能更加直接。因此,旁路途径的抑制有望会比经典补体途径抑制更耐受且更有效。

[0048] 考虑到用于本发明的治疗 TBI 和 SCI 及相关病症的方法中的补体旁路特异性抑制剂具有极大的潜在疗效,本发明的发明人已经开发了几种抗因子 B 的抑制性单克隆抗体并且已经在 TBI 实验模型和 SCI 实验模型中对它们中的一种进行了测试。这些抗体在 2005 年 11 月 24 日公开的公开号为 2005-0260198-A1 的美国专利申请和 2005 年 8 月 25 日公开的公开号为 WO2005/077417 的 PCT 申请中有详细的描述,上述专利申请全文以引用的方式纳入本说明书。

[0049] 简言之,为产生抗体,给基因打靶的因子 B 缺陷型小鼠(fB^{-/-})注射一种融合蛋白,所述融合蛋白由与小鼠 IgG1 同种型的铰链、CH2 和 CH3 结构域连接的因子 B 的第二和第三短同源重复序列(SCR)结构域构成(参见图 1)。选择这些 SCR 结构域是因为它们是 fB^{-/-} 型小鼠的因子 B 基因缺失区段的一部分。筛选出对因子 B 有免疫应答的小鼠(例如使用 ELISA),并且将一只注射后小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合。一种所得的杂交瘤(命名为 1379)会产生能抑制体外(图 2A 和 2B)和体内(图 3)补体旁路激活的 IgG1 抗体。具体地说,在两种旁路途径活性的体外测定中测试了这种抗体(图 2A 和 2B),并且显示出所述抗体能够完全抑制人血清造成的红细胞裂解,因此确证了该试剂具有完全阻断补体旁路激活的能力。在单次注射抑制性抗体后的各个时间测试小鼠的旁路途径抑制情况时,1mg 抗体会导致在 IV 注射后的 1 小时内以及 IP 注射后的 2 小时内的完全抑制(图 3)。IP 注射了 1mg 注射液的小鼠在 24 小时,旁路途径保持完全抑制,注射了 2mg 注射液的小鼠在注射后直至 48 小时保持完全抑制。每隔一天本发明的发明人会重复 i. p. 注射 2mg 所述 1379 抗体,持续 14 天,结果显示最后一次注射后,补体旁路的完全抑制维持至少 48 小时。此外,由该抗体制备的 Fab 片段也会导致旁路途径的完全抑制,其摩尔水平与完整的 1379 抗体大致相等。

[0050] 1379 抗体抑制下列动物血清中的旁路途径激活:小鼠、大鼠、人、狒狒、恒河猴、猕

猴(cyno monkey)、猪、兔和马(表 1)。

[0051] 表 1

旁路途径被 mAb1379 完全抑制的物种	
[0052]	小鼠
	人
	大鼠
	狒狒
	恒河猴
	猪
	猕猴
[0053]	马
旁路途径未被 mAb1379 抑制的物种	
	狗
	豚鼠

[0054] 表 2 中示出了本发明人生产的抗因子 B 抗体的列表。如上所述,本发明的发明人已经证明了所述 mAb1379 能结合并抑制小鼠和人的因子 B。相比而言,命名为 624 的 mAb 能够结合小鼠和人的因子 B,但不抑制人的旁路途径。如竞争试验中所示,抗体 624、691 和 1231 不会阻断 1379 的结合。因此,这些抗体一定是在不同的位点与蛋白结合的,这解释了为什么它们能在体外结合因子 B 而不抑制其功能。但是,抗体 395、1322 和 1060 是 1379 的竞争性抑制剂。

[0055] 表 2

[0056]

克隆	同种型	结合小鼠 fB	结合人 fB	抑制小鼠 旁路途径 (酵母聚 糖测定 法)	抑制人旁 路途径 (兔红细 胞裂解测 定法)	与 1379 竞 争结合人 fB
1379	IgG1 κ	+++	+++	+++	+++	+++
395	IgG1 κ	+++	++	++	+++	+++
1322	IgG2b κ	+++	+++	+	++	+++
624	IgG1 κ	+++	+++	+	-	-
691	IgG1 κ	+++	+++	+	-	-
1060	IgG2b κ	+++	+++	+	++	++
1231	IgG1	+++	+++	+	-	-
E1128		-	+++	-	0	NA

[0057] 使用表位定位来证明该抗体结合因子 B 的第三短同源重复序列(SCR) 结构域, 且该抗体阻止 C3bBb 复合物的形成。此外, 针对 mAb1379 抗体的表位定位实验表明因子 B 上的表位或抗体结合位点是非线性的。实验证明向人因子 B 的 SCR2 和 SCR3 而非 SCR1 中引入某些丙氨酸置换会导致 1379 抗体结合因子 B 的能力的丧失或基本丧失, 这包括进行了以下置换的突变体: 用 His-Cys-Pro 置换 139-Tyr-140-Cys-141-Ser (所述位置与 SEQ ID NO: 2 所代表的成熟的人因子 B 相关); 用 Gly-Asn-Gly-Val 置换 182-Glu-183-Gly-184-Gly-185-Ser。

[0058] 对能被 mAb1379 识别的人因子 B 的推定保守性结合表面或表位进行建模。简言之, 人因子 B 的三级结构是基于所解析出的 CR2-SCR1-2 (蛋白质数据库(PDB) 编号: 1GHQ) 的三维结构建立的。图 4 示出了因子 B 结构的模型, 注明了对应于 mAb1379 表位(相对于 SEQ IDNO: 2) 的氨基酸位置。被认为能构成针对 mAb1379 抗体的构象表位的残基为: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192, 但是所述表位可以仅含有一些图 4 中所示的残基、基本上含有全部的图 4 中所示的残基或者所含残基比图 4 中所示的残基多。图 5 为示出结合了因子 B 的 mAb1379 (一个 Fab 片段) 的模式化复合物的示意图, 所述 Fab 的抗原结合侧已经被建模为覆盖整个定位表位区, 如上述图 4 中所示。

[0059] 上述本发明的发明人所制备的抗体(在公开号为 2005-0260198-A1 的美国专利申请和公开号为 W02005/077417 的 PCT 申请中有更详细的描述)能识别因子 B 上的、人和许多其他动物物种所共有的位点, 对此已进行了临床前的原理求证实验, 因此, 使得能够容易地将人疾病模型中的发现转变为人类疗法。这些抗体被认为是第一批显示出能在多个物种中抑制因子 B 的抗因子 B 抗体。因此, 已经在因子 B 上鉴定了一个独特位点, 针对该位点可以开发出新的抑制剂。

[0060] 在本发明中, 本发明的发明人发现了并在本文中首次报道了抑制旁路途径会抑制外伤性脑损伤(TBI) 中的生理损害, 并且也会抑制脊髓损伤(SCI) 中的生理损害, 现在这一信息可以被用于设计、分离和 / 或鉴定用于治疗 TBI 和 SCI 的新型治疗剂。此外, 先前本发

明人所制备和描述的抗体是用于本发明的方法的优良试剂。

[0061] 本发明的一个实施方案涉及一种用于在动物体内减少或预防由外伤性脑损伤 (TBI) 导致(与之相关)的至少一种症状或病症(残疾、缺损、生理损害)、或用于加强(促进)从 TBI 导致的损害中恢复的方法,包括选择性抑制遭受 TBI 的动物体内的补体旁路。本发明的另一个实施方案涉及一种用于在动物体内减少或预防由脊髓损伤 (SCI) 导致(与之相关)的至少一种症状或病症(残疾、功能缺损、生理损害)、或用于加强(促进)从 SCI 导致的损害中恢复的方法,包括选择性抑制遭受 SCI 的动物体内的补体旁路。在一个优选的实施方案中,所述方法包括给予所述动物一种抑制补体旁路的试剂,特别是一种抑制因子 B 的试剂。在一个特别优选的实施方案中,所述试剂为抗因子 B 抗体或其抗原结合片段。

[0062] 因此,本发明的方法包括选择性抑制动物体内的补体旁路的步骤,所述动物具有分别由 TBI 或 SCI 导致的生理损害,或有产生分别由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的风险。根据本发明,抑制动物体内的补体旁路是指抑制至少一种下述蛋白或编码这类蛋白的核酸分子的表达和 / 或生物活性,所述蛋白为补体旁路的一部分。这类蛋白包括但不限于因子 B、因子 D 或备解素。“选择性”抑制补体旁路是指本发明的方法优先地或排他地抑制补体旁路,但不抑制或至少基本不抑制补体激活的其他途径,包括经典补体途径或凝集素途径。例如,本发明的新型因子 B 抗体及其抗原结合片段就是选择性抑制补体旁路的试剂的一个实例。“选择性”抑制特定的蛋白是指本发明的方法优先地或排他地抑制该特定蛋白质的表达和 / 或生物活性,但不抑制或至少基本上不抑制其它蛋白质的表达和 / 或生物活性(除非这种生物活性是与所述特定蛋白共有的,如下游事件)。

[0063] 根据本发明,外伤性脑损伤 (TBI) 被定义为由任何类型的头部创伤例如对头部的撞击或震荡等导致的任何损伤、创伤或损害。更具体地说,TBI 是由外部物理作用力造成的获得性脑损伤,导致全部或部分的功能丧失或心理社会障碍,或两者都会导致。该术语用于会导致一个或多个方面功能缺损的开放性和闭合性头部损伤,所述一个或多个方面为例如认知,语言,记忆,注意力,推理,抽象思维,判断,问题求解,感觉、知觉和运动能力,心理社会行为,躯体功能,信息处理和言语。该术语通常不用于先天性或退行性脑损伤或者产伤导致的脑损伤,但是后一种类型的创伤也可以用本发明的方法来治疗。TBI 可导致各种生理和心理症状、病症或功能缺损,包括体格缺陷(例如言语、视力、听力和其它感觉障碍;头痛;缺乏精细运动协调;肌肉痉挛;一侧或两侧轻瘫或麻痹及癫痫发作;平衡障碍和其它的步态障碍)、认知障碍(例如短期和长期记忆丧失、注意力不集中、思维迟钝和注意力广度受限,以及知觉障碍、交流技能障碍、阅读技能障碍和书写技能障碍、计划障碍、排序障碍和判断障碍)和心理社会-行为-情绪障碍(例如疲劳、心态不稳、否认、自我中心、焦虑、抑郁、自尊下降、性功能障碍、不安、缺乏动力、无法自我监控、情绪控制困难、无法应付、激动、过度的大笑或大哭和其它相关困难)。TBI 诊断的详细讨论如上所述。

[0064] 本领域中诊断 TBI 的方法已很成熟。通常,TBI 是通过创伤历史、临床状况和成像研究(例如 x 射线和计算机控制断层摄影术 (CT) 扫描)来诊断的。特别重要的是使用复苏后格拉斯哥 (Glasgow) 昏迷 (GCS) 评分 (Teasdale and Jennett, 1974, Lancet2(7872):81-84),因为这一参数是治疗结果的重要预测指标。当评估 GCS 时,用最好的反应来计算评分。患有轻度头部损伤 (GCS14 或 15) 的患者占急诊科所收纳的所有头部创伤患者的约 80%。中度头部损伤对应的 GCS 评分在 9 至 13 之间,并且与颅内病症相对于轻度头部损伤患者风险

上升相关。8分或更少的GCS评分对应于昏迷的患者,所述昏迷的患者被定义为不能睁开眼睛、不能服从命令和无语言反应。因此,严重的头部损伤被定义为GCS评分在3至8之间。当对患者进行评估时,除GCS和意识水平评估外,神经检查通常包括对瞳孔大小和反应性的评估和对外周运动能力的简单评价。进一步的临床检查包括对头皮撕裂的检查,对颅骨陷入性骨折(impression fracture)的触诊和对颅底骨折间接体征的检查,所述间接体征包括眼眶周围瘀斑(“黑眼圈”)、耳后瘀斑(“巴特尔征”)、CSF漏导致的鼻漏/耳漏,以及第VII神经麻痹。在某些情况下,会进行CT扫描。其他昏迷或意识状态改变的原因也会在分析中加以研究,例如通过筛选:药物、代谢功能障碍、内出血或外出血源、原有的非外伤性脑损害(例如缺血性或出血性脑损伤)、癫痫、基底动脉血栓形成、细菌性脑膜炎、脑脓肿或肿瘤。闭合性头部损伤的形态学分类是基于根据Marshall和其同事的指导(Marshall et al., J. Neurosurg. 1991, 75:S14-S20)进行的CT扫描的结果来进行的。颅内损伤可以是局灶的(硬膜下出血、硬膜外出血、脑内出血;“清除的”与“未清除的”)或弥散的(I-IV级)。例如,在Vos et al., 2002, Eur. J. Neurol. 9:207-219和Gaetz, 2004, Clin. Neurophysiol. 115:4-18中记载了对用于评估TBI的参数所进行的详细讨论。

[0065] 根据本发明,脊髓损伤(SCI)被定义为任何导致功能(如运动或感觉)丧失的脊髓损伤、创伤或损害。损伤的常见原因是外伤(例如交通事故、枪击、跌倒等)或疾病(脊髓灰质炎、脊柱裂、弗里德赖希(氏)共济失调等)。不必切断脊髓也可出现功能丧失。在大多数患有SCI的个体中,脊髓是完整的,但是对其的损害会导致功能丧失。除了感觉丧失或运动功能丧失,患有SCI的个体也可能会经历包括肠和膀胱功能障碍、性功能障碍和生育功能障碍、不能有效调节血压、体温控制减弱、在损伤位置以下不能出汗和慢性疼痛在内的症状、病症或功能缺损。患有SCI的患者可能具有任何水平的SCI,这通常由受损位置来定义(例如在颈椎8或胸椎12处或其下任何位置)。较高位的损伤(C-1、C-2)会导致包括呼吸能力在内的许多非自主功能的丧失,被迫使用呼吸辅助装置,例如机械呼吸机或膈肌起搏器。

[0066] 本领域中诊断脊髓损伤的方法已很成熟。在急诊室中,医生能够通过仔细检查受损的患者、测试感觉功能和运动情况以及询问意外事故情况来排除脊髓损伤。如果受损的患者抱怨颈痛、不完全清醒或有明显虚弱或神经损伤体征,就需要进行急诊测试。这类测试包括X射线、计算机控制断层摄影术(CT)扫描、磁共振成像(MRI)或脊髓造影术。也会进行各种神经学检查。SCI的影响取决于损伤的类型和损伤的位置。SCI通常可被分为两类损伤——完全损伤和不完全损伤。完全损伤是指在损伤位置以下无功能(即无感觉和无法随意运动)。身体两侧都受到同样的影响。不完全损伤是指在主要的损伤位置以下仍有某些功能。不完全损伤的患者可能不仅能够移动一肢,可能能够感觉到部分无法移动的身体或可能身体一侧的功能比另一侧要多。随着在SCI紧急治疗方面的进展,不完全损伤将变得越来越常见。

[0067] 损伤的位置非常有助于预测在SCI中身体的哪部分可能会受到麻痹和功能丧失的影响。颈部(颈)损伤通常会导致四肢瘫痪。C-4节段以上的损伤会导致患者需要呼吸机来呼吸。C-5损伤通常会导致可控制肩和二头肌,却无法控制腕或手。C-6损伤通常会导致可控制腕,却无法控制手功能。C-7和T-1受损的个体可以伸直他们的胳膊,但是手和手指仍有灵活性问题。胸位及以下位置的损伤会导致截瘫而手不受影响。T-1至T-8处受损时常常可以控制手,但是由于无法控制腹肌而几乎不能控制躯干。较低的T-损伤(T-9至

T-12) 能够很好的控制躯干和腹肌。坐姿平衡很好。腰和骶骨损伤会使得对臀屈肌和腿的控制减弱。四肢瘫痪的患者的脊髓的 8 段颈椎之一受到了损伤;截瘫的患者在脊髓的胸、腰或骶骨段受到了损伤。

[0068] 本发明涉及抑制生理损害和与这类损害相关的症状或病症(残疾、功能缺损),它们通常是由上文所详述的 TBI 或 SCI 导致的。因此,并不要求完全预防或逆转该生理损害或该病症的所有影响,但是本发明的方法的作用可能对患者有明显的疗效。因此,疗效不必完全预防或治愈 TBI 或 SCI 所导致的特定病症或生理损害,但是可以包括以下结果:减轻或预防 TBI 或 SCI 所导致的症状或生理损害,减少或防止这类症状或损害的发生(定量地或定性地),减轻这类症状或生理影响的严重程度和/或加强遭受 TBI 或 SCI 后的患者的恢复。特别是,本发明的组合物在被给至患者时优选地预防与脑损伤或脊髓损伤相关的损害,和/或减轻或缓解与所述损害相关(导致)的症状或病症、所述损害的体征甚至所述损害的原因,以及加强所述损害的恢复。因此,保护患者免受 TBI 或 SCI(或相关病症)导致的生理影响或症状包括预防或减少损害作用的发生和/或严重程度并且治疗损害作用已经在其体内发生或开始发生的患者。本领域普通技术人员和/或正在治疗患者的受训过的临床医师可以容易地评估疗效。例如,上述用于诊断 TBI 或 SCI 的许多方法可以被用于评估使用本发明方法治疗前后的患者,以评估治疗是否成功。优选地,与未用本发明治疗的患者相比,至少有一种用于评估用本发明治疗的患者的临床或生物学评分、数值或量度显示出在严重程度或发病率方面有积极的或有益的差异。

[0069] 为抑制由 TBI 或 SCI 导致生理损害和与这类损害相关的症状或病症(残疾、功能缺损),根据本发明进行的补体旁路抑制可通过直接影响补体旁路中蛋白质的表达(转录或翻译)或生物学活性来实现,或者通过直接影响某一蛋白质结合补体旁路中蛋白质的能力或直接影响某一蛋白质通过旁路途径以其它方式帮助激活补体的能力来实现。更具体地说,在一个实施方案中,蛋白质表达是指蛋白质的转录或蛋白质的翻译。因此,本发明的方法可以抑制动物体内的一种蛋白质的转录和/或翻译(例如通过给予一种抑制所述蛋白表达的试剂,以及对动物进行遗传改造以使蛋白表达下降),所述动物天然地表达该蛋白。在另一个实施方案中,补体旁路的抑制在本文中被定义为通路活性的任何可测量(可检测)的下降(即下降、下调、抑制),例如被定义为补体旁路中蛋白质的表达和/或生物活性的任何可测量的下降,并且可以包括阻断或抑制蛋白或分子在补体旁路中起作用的能力。

[0070] 抑制蛋白质表达的方法包括但不限于给予一种(直接地或间接地)抑制所述蛋白表达的试剂,以及对动物进行遗传改造以使蛋白表达下降(例如本文所用的、标注为 fB-/- 的小鼠)。优选地,蛋白质表达可通过给予所述动物一种直接抑制蛋白质表达的试剂来抑制。这类试剂包括但不限于:特异性针对编码所述蛋白质的 RNA 的核酶或 RNAi、与编码所述蛋白质的基因或 RNA 结合并抑制该蛋白质表达的 DNA 结合蛋白或药物、结合所述蛋白质的适体、在细胞内与所述蛋白质结合并防止表达所述蛋白的细胞分泌所述蛋白的蛋白质或药物、以及通过在高严格条件下与动物细胞内编码所述蛋白的基因杂交来减少所述蛋白表达的分离的核酸分子(例如反义核酸分子)。这类选择性抑制蛋白质表达的化合物可以用本领域技术人员已知的技术来生产。

[0071] 因此,本发明的方法包括使用各种试剂(即调节性化合物),所述试剂通过直接作用于补体旁路中的蛋白质来选择性抑制补体旁路中一种或多种蛋白质的表达和/或生物

活性,从而减轻动物体内 TBI 或 SCI 相关的生理损害。本发明所用的试剂包括例如蛋白质、核酸分子、抗体和作为推理性药物设计产物的化合物(即药物)。本文中这类试剂通常是指抑制剂。

[0072] 根据本发明,抑制剂是任何能通过直接抑制或竞争性抑制作用来抑制蛋白质(例如补体旁路中的蛋白质)的表达和 / 或生物活性的试剂,并包括作用于因子 B、因子 D 或备解素的试剂。在本发明的一个实施方案中,补体旁路抑制或补体旁路中蛋白质的抑制在本文中被定义为补体旁路中蛋白质生物活性的任何可测量(可检测)的下降(即减小、下调、抑制)。蛋白质的生物活性或生物作用是指由体内(即在蛋白质的天然的生理环境中)或体外(即在实验室的条件下)所测量或观察到的蛋白质的天然存在形式所呈现的或所执行的任何功能。例如,因子 B 的生物活性可以包括但不限于,结合激活的 C3、溶解免疫复合物、B 细胞生长因子活性和单核细胞激活。因子 D 的生物活性可以包括但不限于,催化切割与 C3 形成复合物时的因子 B、催化 Ba 和 Bb 的形成。备解素的生物活性可以包括但不限于,结合并稳定与 C3bBb 结合的细胞或免疫复合物以及稳定 C3/C5 转化酶。

[0073] 根据本发明,所述的蛋白质生物活性可以通过直接阻碍或抑制(减少、降低)蛋白质结合和 / 或激活另一种蛋白质(例如 C3)的能力,从而抑制这类结合导致的下游事件来抑制。优选地,补体旁路的生物活性可通过给予一种抑制该途径中的至少一种蛋白质的试剂来抑制,这类试剂包括但不限于,与该途径中的蛋白质结合或通过抑制或阻止该途径中的蛋白质结合和 / 或激活另一种蛋白质的能力的方式来与所述途径中的蛋白质竞争的试剂。

[0074] 抑制补体旁路中蛋白质的试剂可包括但不限于,作为推理性药物设计产物的化合物、天然产物和具有部分确定调节性质的化合物。包括所给定的蛋白质的拮抗剂在内的调节剂可以是基于蛋白质的化合物、基于碳水化合物的化合物、基于脂质的化合物、基于核酸的化合物、天然有机化合物、合成来源的有机化合物或药物、抗体(包括其抗原结合片段)或其片段。本发明中所用的一类具体试剂为补体旁路的拮抗剂,包括该途径中的蛋白质的拮抗剂。根据本发明,“拮抗剂”是指任何抑制(例如拮抗、减小、降低、阻断、逆转或改变)给定蛋白质作用的化合物。更具体地说,拮抗剂能够以与所给定蛋白质活性相关的方式起作用,从而以拮抗(例如对抗、逆转、对立)给定蛋白质的天然作用的方式来降低或阻断给定蛋白质的生物活性。拮抗剂可以包括但不限于抗体或其抗原结合片段、蛋白质、肽、核酸(包括核酶和反义核酸)或能提供拮抗作用的药物 / 化合物 / 肽设计或选择的产物。例如,本发明包括天然蛋白质、因子 B、因子 D 或备解素的任何拮抗剂,包括抗体拮抗剂、蛋白质 / 肽拮抗剂、核酸拮抗剂或小分子拮抗剂(例如小分子抑制剂)。

[0075] 在一个实施方案中,本发明的调节试剂包括药物,包括能调节一种或多种补体旁路蛋白的产生和 / 或功能的肽、寡核苷酸、碳水化合物和 / 或合成有机分子。例如,这类试剂可以通过分子多样性策略(能够快速构建大的化学多样性分子文库的相关策略的组合)、自天然或合成化合物文库、特别是化学或组合文库(即序列和大小不同但具有相同结构单元的化合物的文库)或通过推理性药物设计来获得。例如,参见 Maulik et al., 1997, *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*, Wiley-Liss, Inc., 其全文以引用的方式纳入本说明书。

[0076] 在分子多样性策略中,使用生物学、酶学和 / 或化学方法由例如肽、寡核苷酸、碳水化合物和 / 或合成的有机分子合成了大的化合物文库。开发分子多样性策略的关键参数

包括亚单元多样性、分子大小和文库多样性。筛选这类文库的主要目标是连续利用组合选择来获得针对预期靶标的高亲和性配体,然后通过随机或定向设计策略来优化先导分子。分子多样性的方法在上文的 Maulik, et al. 中有详细描述。

[0077] 在推理性药物设计过程中,调节性化合物的三维结构可通过例如核磁共振(NMR)或 X 射线晶体学来分析。然后可以使用这一三维结构来预测潜在化合物的结构,如通过计算机建模来预测潜在的调节剂。所预测的化合物结构可被用来优化例如通过分子多样性方法产生的先导化合物。此外,所预测的化合物结构可通过例如化学合成、重组 DNA 技术或通过从天然来源(例如植物、动物、细菌和真菌)分离模拟表位(mimotope)来制备。

[0078] 上文的 Maulik, et al., 1997 中公开了各种其他的基于结构的药物设计方法。Maulik 等人公开了例如定向设计方法(其中用户指导自经恰当地选择的片段的片段文库来构造新型分子的过程)、随机设计(其中用户使用遗传算法或其他算法随机地突变片段及其组合,同时利用一种选择标准来评估候选配体的适合度)以及基于网格的方法(其中用户计算三维受体结构与小片段探针之间的相互作用能,然后将有利的探针位点连接起来)。

[0079] 用作抑制补体旁路中蛋白质(或其表达)的试剂的分离的核酸分子为反义核酸分子、核酶、siRNA 或适体。本文所用的反义核酸分子被定义为能通过在高严格条件下与编码一种蛋白的基因杂交来减少所述蛋白表达的分离的核酸分子。这类核酸分子与编码所述蛋白质的基因足够相似,以至于它能够在高严格条件下与编码所述天然蛋白的基因或 RNA 的编码链或互补链杂交。RNA 干扰(RNAi)是一种利用双链 RNA 和小干扰 RNA (siRNA) (在哺乳动物系统中)来抑制或沉默互补基因的表达的方法。在靶细胞中,siRNA 解旋并与 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)连接,然后被引导到与 siRNA 互补的 mRNA 序列处,由此 RISC 可切割 mRNA。核酶是一段通过与靶 RNA 部分结合来起作用并通过在特定剪切位点切割磷酸二酯骨架来使其失活的 RNA 区段。适体是根据它们是否具有以高亲和性和特异性与预定的特定靶分子结合的能力来从随机组合核酸文库中选出的合成的核酸短链(通常是 RNA,但也可以是 DNA)。适体具有特定的三维结构,并能够区分在结构上有细微差别的化合物。

[0080] 基因包括能调控由该基因编码的蛋白质的产生的调节区(例如但不限于转录、翻译或翻译后调控区)以及所述编码区本身。所述编码各种补体旁路蛋白质(包括因子 B、因子 D 或备解素)的基因已经被鉴定,并且是本领域已知的。分离的核酸分子是已经从其天然环境中被移出的核酸分子(即已经受过人为处理),可以包括 DNA、RNA 或者 DNA 或 RNA 的衍生物。因此,“分离的”不能反映所述核酸分子被纯化的程度。本发明的分离的核酸分子可以是其天然来源分离的或者是利用重组 DNA 技术(例如聚合酶链式反应(PCR)扩增、克隆)或化学合成产生的。

[0081] 本文所用的杂交条件是指可使用核酸分子来鉴定相似核酸分子的标准杂交条件。例如, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989 中公开了这类标准条件。上述 Sambrook et al. 的全文以引用的方式纳入本说明书(具体请参见 9.31-9.62 页)。此外,例如, Meinkoth et al., 1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284 中公开了用于计算实现不同程度核苷酸错配的杂交的合适的杂交和洗涤条件的公式;上述 Meinkoth et al. 的全文以引用的方式纳入本说明书。

[0082] 在本发明的一个优选实施方案中,为抑制由 TBI 或 SCI 导致的生理损害(及这类损害相关的症状或病症(残疾、功能缺损))而用于抑制补体旁路的蛋白的试剂为抗体或其抗

原结合片段。类似地,本发明也特别优选地使用抗原结合多肽。一方面,所述抗体选择性结合所述补体旁路的蛋白质,从而抑制或阻止了所述蛋白质结合另一种通常(在天然或生理条件下)会与它相互作用的蛋白质。另一方面,所述抗体选择性结合所述蛋白质,从而抑制或阻止了所述蛋白质激活另一种通常会与它相互作用的蛋白质,虽然所述蛋白可能至少部分地与另一种蛋白质结合。为抑制由 TBI 或 SCI 导致的生理损害而在选择性抑制旁路途径中所使用的特别优选的抗体及其抗原结合片段会在下文中加以详述(例如本文所述的因子 B 抗体,特别是本文所详述的 mAb1379 抗体)。

[0083] 优选地,本发明所用的抗体或其抗原结合片段与选自因子 B、因子 D 或备解素的蛋白质结合。最优选地,本发明包括与因子 B 结合的抗体或其抗原结合片段,以及它用于抑制由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的用途。本说明书详细描述并举例说明了根据本发明的选择性结合因子 B 并抑制补体旁路的抗体(和其抗原结合片段)。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段与这样一种蛋白质(例如因子 B)的保守性结合表面或表位结合,所述蛋白质在动物物种特别是哺乳动物物种中是保守的(即所述抗体可与两种或多种不同的哺乳动物物种的蛋白质交叉反应)。具体地,本发明包括能与至少两种且优选多种不同的哺乳动物物种(包括但不限于人、非人灵长类、小鼠、大鼠、猪、马和兔)的因子 B 结合的抗体。优选地,本发明包括能与人和至少另一种动物物种、优选至少另一种哺乳动物物种(包括但不限于非人灵长类、小鼠、大鼠、猪、马和兔)的因子 B 结合的抗体。在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段与因子 B 的第三短同源重复序列(SCR)结合。在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段与阻止因子 D 切割因子 B 的因子 B 的一个区结合。在一个实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。在一个实施方案中,所述抗体为本文中被称为 1379 的抗体(即所述抗体是由相同编号的杂交瘤细胞系产生的,ATCC 保藏号为 PTA-6230)或其抗原结合片段。

[0084] 按照国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约的规定,本文中称为 1379 的杂交瘤(或 mAb1379)于 2004 年 9 月 21 日保藏于美国典型菌种保藏中心(ATCC,位于弗吉尼亚 20110-2209 马纳萨斯大学大道 10801),ATCC 保藏号为 PTA-6230。

[0085] 根据本发明,蛋白质、蛋白质的一部分(例如片段、部分、结构域等)或者蛋白质的区域或表位的最小的尺寸是足够作为用来生成抗体的表位或保守性结合表面或作为体外测定法的靶标的尺寸。在一个实施方案中,本发明的蛋白质的长度为至少约 4、5、6、7 或 8 个氨基酸(例如,适于抗体表位或适于作为测定中可检测的肽),或长度为至少约 25 个氨基酸、或长度为至少约 50 个氨基酸、或长度为至少约 100 个氨基酸、或长度为至少约 150 个氨基酸等等,长度为 4 个氨基酸起直至蛋白质或其一部分的全部长度或更长范围内的任何长度,包括所有整数形式的长度(例如 8、9、10...25、26...500、501...)

[0086] 编码人因子 B 和其它补体蛋白质的基因和编码区的核苷酸序列以及这类蛋白质的氨基酸序列在本领域中是众所周知的。例如编码人因子 B 和其它补体蛋白的基因在 NCBI 数据库中的登录号为 NG_000013。因子 B 的编码序列在 NCBI 数据库中的登录号为 NM_001710,因子 B 前蛋白原的氨基酸序列在 NCBI 数据库中的登录号为 NP_001701 或 P00751。在 NCBI 数据库中的登录号为 P00751 的氨基酸序列在本文中被表示为 SEQ ID NO:1,它是人因子 B 前蛋白原序列。其它动物物种的序列在本领域中也是已知的。通过比较发现,在小鼠因子 B 序列(例如参见 NCBI 数据库登录号 P04186,在本文中被表示为 SEQ ID NO:6)中,第三 SCR 结构域位于该 761 个氨基酸的前蛋白的 160-217 位,且成熟的鼠类因

子 B 蛋白涵盖 SEQ ID NO:6 的 23-761 位。人因子 D 的编码序列在 NCBI 数据库中的登录号为 NM_001928.2, 人因子 D 前蛋白原的氨基酸序列在 NCBI 数据库中的登录号为 NP_001919 (在本文中被表示为 SEQ ID NO:7)。人备解素的编码序列在 NCBI 数据库中的登录号为 NM_002621.1, 人备解素的氨基酸序列在 NCBI 数据库中的登录号为 NP_002612 (在本文中被表示为 SEQ ID NO:8)。

[0087] 由 SEQ ID NO:1 所代表的人因子 B 前蛋白为 764 个氨基酸的蛋白质, 信号肽涵盖 1-25 位的氨基酸。因子 B 的成熟链对应于 SEQ ID NO:1 的 26-764 位, 在本文中被表示为 SEQ ID NO:2。人因子 B 的三个 SCR 区域在本文中被表示为 SEQ ID NO:3 (SCR1, 也称为 Sushi1, 涵盖了 SEQ ID NO:1 的约 35- 约 100 位或 SEQ ID NO:2 的约 5- 约 75 位), SEQ ID NO:4 (SCR2, 也称为 Sushi2, 涵盖了 SEQ ID NO:1 的约 101- 约 160 位或 SEQ ID NO:2 的约 76- 约 135 位) 和 SEQ ID NO:5 (SCR3, 也称为 Sushi3, 涵盖了 SEQ ID NO:1 的约 163- 约 220 位或 SEQ ID NO:2 的约 138- 约 195 位)。

[0088] 基于使用 Hourcade, 1995, J. Biol. Chem 所述的片段的因子 B 的表位定位, 在一个优选的实施方案中, 本发明所用的抗因子 B 抗体优选地结合所述第三 SCR 结构域的一部分中的或含有所述第三 SCR 结构域的一部分的表位或保守性结合表面, 更优选地, 结合至少包括含有成熟因子 B 蛋白 (SEQ ID NO:2) 的约 Tyr139 位至约 Ser185 位的序列部分的人因子 B 的表位, 结合至少包括含有成熟因子 B 蛋白 (SEQ ID NO:2) 的约 Tyr139 位至约 Ser141 位的序列部分的人因子 B 的表位, 结合至少包括含有成熟因子 B 蛋白 (SEQ ID NO:2) 的约 Glu182 位至约 Ser185 位的序列部分的人因子 B 的表位, 结合至少包括人因子 B (SEQ ID NO:2) 的一部分的因子 B 的表位, 所述部分包括下列位置, 或它们在非人因子 B 序列中的等效位置: Tyr139、Cys140、Ser141、Glu182、Gly184 或 Ser185; 或结合至少包括非人动物物种中等效位置的一部分的因子 B 的表位。本领域技术人员可以容易地将人因子 B 序列与另一种动物物种的因子 B 序列进行比对, 并确定 SCR 区域的位置和对应于上述氨基酸位置的第三 SCR 区域的具体部分。例如可以使用 Tatusova and Madden, (1999), "Blast2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250 中所述的 BLAST2 序列比对法对两条具体的序列进行比对, 所述文献的全文以引用的方式纳入本说明书。

[0089] 基于对本发明中所用的示例抗体的其他表位建模和表位定位, 在另一个优选的实施方案中, 本发明中所用的抗因子 B 抗体优选地结合因子 B 第三 SCR 结构域的部分或一部分中或含有因子 B 第三 SCR 结构域的部分或一部分的表位 (保守性结合表面), 所述部分或一部分包括 SEQ ID NO:2 的一个或多个下列氨基酸位置或它们在非人因子 B 序列中的等效位置: A137、Y139、S141、E182、S185、T189、E190 和 S192。在本发明的一个方面中, 所述表位在因子 B 第三 SCR 结构域的部分或一部分中或包含因子 B 第三 SCR 结构域的部分或一部分, 所述部分或一部分包括全部或基本上全部 (至少 5、6 或 7 个) 下列的 SEQ ID NO:2 的氨基酸位置或者它们在非人因子 B 序列中的等效位置: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。又一方面, 由本发明中所用的抗因子 B 抗体识别的表位在因子 B 第三 SCR 结构域的部分或一部分中或包含因子 B 第三 SCR 结构域的部分或一部分, 所述部分或一部分由下列的 SEQ ID NO:2 的氨基酸位置或者它们在非人因子 B 序列中的等效位置组成: Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190 和 Ser192。

[0090] 在一个实施方案中,由本发明中所用的因子 B 抗体识别的表位也可以被更具体地定义为位于因子 B 第三 SCR 结构域的一部分的三维结构中的非线性表位。包含所述表位的部分为由 SEQ ID NO:2 的 Ala137-Ser192 基本上全部(例如,至少约 90%)氨基酸位置或非人因子 B 序列中的等效位置限定的因子 B 的三维结构,条件是这些序列是按照它们在天然全长因子 B 序列中的构象排列的。例如,图 4 和图 5 示出了因子 B 的三维结构模型,该模型示出了针对 mAb1379 的表位。本文所用的蛋白质“三维结构”或“三级结构”是指蛋白质组成的三维排列。该术语是本领域技术人员公知的。本文所用的术语“模型”是指蛋白质、多肽或肽的三维结构在有形介质中的表现形式。例如,模型可以是三维结构在电子文件中、电脑屏幕上或纸上(即在二维介质上)的表现形式和 / 或为球棍图。

[0091] 根据本发明,在提及抗体时,给定蛋白质或肽或其他分子的“表位”通常被定义为将与抗体或其抗原结合片段结合并且将用来产生抗体的较大分子的一部分或其上的某一位点。术语“表位”可以与术语给定蛋白质或抗原的“抗原决定簇”、“抗体结合位点”或“保守性结合表面”互换使用。更具体地说,表位可以由参与抗体结合的氨基酸残基定义,也可以由它们的三维空间构象(例如构象表位或保守性结合表面)来定义。表位可以包含于约 4-6 个氨基酸残基的小肽中,或者可以包含于蛋白质的较大区段中,并且当提及表位(特别是提及抗体结合表位)的三维结构时,所述表位不必包含连续的氨基酸残基。抗体结合表位通常是构象表位而不是序列表位(即线性表位),换言之,是由在抗体所结合的蛋白质或多肽表面上按三维排列的氨基酸残基所限定的表位。如上所述,所述构象表位不含连续的氨基酸残基序列,相反,所述残基在一级蛋白质序列中还可能是被远远隔开的,并且这些残基通过蛋白质在三维空间按天然构象折叠被汇集在一起以形成结合表面。由 mAb1379 识别的表位为构象表位而不是线性表位。

[0092] 本领域技术人员可以使用已知技术来鉴定和 / 或装配构象表位和 / 或序列表位,所述已知技术包括突变分析(例如定点诱变),预防蛋白水解性降解(蛋白质足迹法),使用例如合成肽和肽扫描、BIAcore 或 ELISA 进行的模拟表位分析,抗体竞争性定位,组合肽文库筛选,基质辅助激光解吸 / 电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱或三维建模(例如使用任何适合的软件程序,包括但不限于 MOLSCRIPT2.0(Avatar Software AB, Hele neborgsgatan21C, SE-11731 Stockholm, Sweden), 图像显示程序 O(Jones et. al., Acta Crystallography, vol. A47, p. 110, 1991), 图像显示程序 GRASP 或图像显示程序 INSIGHT)。例如,技术人员可以使用分子置换或其他技术和相关蛋白质的已知三维结构来对因子 B 的三维结构建模并且预测会结合该结构的抗体的构象表位。事实上,技术人员可以使用这些技术中的一种或任何组合来定义抗体结合表位。图 4 和图 5 示出了使用三维建模以及模拟表位分析和突变分析的信息来鉴定本发明中所用的因子 B 抗体的表位。

[0093] 本文所用的术语“选择性结合”是指一种蛋白质与另一种蛋白质(例如抗体、其片段或抗原结合配偶体)的特异性结合,其中按任何标准测定法(免疫测定法)所测定的结合水平在统计学上明显高于该测定法的背景对照。例如,当进行免疫测定时,对照通常包括仅含有抗体或抗原结合片段(即无抗原)的反应孔 / 管,其中在无抗原的情况下抗体或其抗原结合片段的反应活性(例如与反应孔非特异性的结合)的量被认为是背景。结合可以使用本领域中的各种标准方法来测量,包括但不限于:蛋白质印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、免疫沉淀、表面等离子体共振、化学发光、荧光偏振、磷

光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸 / 电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱、微细胞计量术、微阵列、显微术、荧光激活细胞分类术 (FACS) 和流式细胞术。

[0094] 本发明的一个实施方案包括使用抗体或其抗原结合片段来抑制 TBI 或 SCI 相关的生理损害或作用,所述抗体或其抗原结合片段为因子 B 与抗因子 B 抗体(例如单克隆抗体 1379) 结合的竞争性抑制剂。根据本发明,因子 B 与本发明的抗因子 B 抗体结合的竞争性抑制剂为这样一种抑制剂(例如另一种抗体或其抗原结合片段或多肽):它与本发明的已知的抗因子 B 抗体(例如 mAb1379) 在相同或相似的表位与因子 B 结合,从而使得所述已知的抗因子 B 抗体与因子 B 的结合被抑制。竞争性抑制剂可以与所述靶标(例如因子 B) 结合,与所述靶标的亲和性要高于抗因子 B 抗体。可以以与本文所述的抗因子 B 抗体 1379 相似的方式(例如抑制补体旁路、抑制由 TBI 或 SCI 导致的生理损害或影响) 来使用竞争性抑制剂。例如,本发明的一个实施方案涉及使用特异性结合因子 B 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段竞争性抑制 mAb1379 与因子 B 的特异性结合,并且其中当所述抗体或其片段与因子 B 结合时,补体旁路受到抑制或者 mAb1379 抑制补体旁路的能力受到抑制。另一个实施方案涉及使用特异性结合因子 B 的分离的抗体或其片段,其中所述分离的抗体或其片段竞争性抑制另一种特异性结合因子 B 的抗体或其片段,并且其中所述另一种抗体或其片段结合因子 B 的第三 SCR 结构域。

[0095] 竞争测定法可以使用本领域的标准技术来进行(例如竞争性 ELISA 或其他结合测定法)。例如,竞争性抑制剂可以根据它们抑制因子 B 与已知的标记过的抗因子 B 抗体(例如 mAb1379) 结合的能力来检测和量化。上文公开号为 2005-0260198-A1 的美国专利申请和公开号为 W02005/077417 的 PCT 申请中描述了存在人因子 B 的情况下的抗体-抗体竞争测定。上文公开号为 2005-0260198-A1 的美国专利申请和公开号为 W02005/077417 的 PCT 申请中也描述了因子 B 与抗因子 B1379 结合的竞争性抑制剂。

[0096] 根据本发明,抗体的特征在于它们包含免疫球蛋白结构域,因而它们是蛋白质的免疫球蛋白超家族的成员。一般来讲,抗体分子包括两类链。一类链是指重链即 H 链,另一类链是指轻链即 L 链。这两种链以等摩尔比存在,每个抗体分子通常具有两条 H 链和两条 L 链。所述两条 H 链是由二硫键连接起来的,且每条 H 链通过二硫键与一条 L 链连接。L 链只有两种类型,lambda (λ) 链和 kappa (κ) 链。相比而言,H 链有五类主要的同种型。这五个类型包括免疫球蛋白 M (IgM 或 μ)、免疫球蛋白 D (IgD 或 δ)、免疫球蛋白 G (IgG 或 γ)、免疫球蛋白 A (IgA 或 α) 和免疫球蛋白 E (IgE 或 ϵ)。这些同种型之间的区别特征根据免疫球蛋白的恒定域来界定,这在下文中有详细讨论。人免疫球蛋白分子包括九类同种型: IgM、IgD、IgE、IgG 的四个亚类(包括 IgG1 (γ 1)、IgG2 (γ 2)、IgG3 (γ 3) 和 IgG4 (γ 4)) 以及 IgA 的两个亚类(包括 IgA1 (α 1) 和 IgA2 (α 2))。在人体内, IgG3 亚类和 IgM 是最有效的补体激活剂(经典补体系统),而 IgG1 亚类是经典补体系统的中度或低度激活剂,其次是 IgG2 亚类。IgG4 亚类不会激活所述补体系统(经典或旁路途径)。已知能激活补体旁路系统的唯一的人免疫球蛋白同种型是 IgA。在小鼠体内, IgG 亚类为 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。鼠类 IgG1 不会激活补体,而 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 是补体激活剂。

[0097] 免疫球蛋白分子的每条 H 或 L 链包括两个区,称为 L 链可变域 (V_L 域) 和 L 链恒定域 (C_L 域) 以及 H 链可变域 (V_H 域) 和 H 链恒定域 (C_H 域)。完整的 C_H 域包括三个亚域 (CH1、CH2、CH3) 和一个铰链区。一条 H 链和一条 L 链能够一起形成具有免疫球蛋白可变区的免

疫球蛋白分子的一条臂。完整的免疫球蛋白分子包括两条相连接(例如二硫键连接)的臂。因此,整个免疫球蛋白的每条臂均包括一个 V_{H+L} 区和一个 C_{H+L} 区。本文所用的术语“可变区”或“V区”是指 V_{H+L} 区(也称为 Fv 片段)、 V_L 区或 V_H 区。本文中所用的术语“恒定区”或“C区”是指 C_{H+L} 区、 C_L 区或 C_H 区。

[0098] 用蛋白酶限制性消化免疫球蛋白可以产生两个片段。抗原结合片段被称为 Fab、Fab' 或 $F(ab')_2$ 片段。缺乏抗原结合能力的片段被称为 Fc 片段。Fab 片段包括免疫球蛋白分子的一条臂,包括与 V_H 区和部分 C_H 区(CH1 域)配对的 L 链(V_L+C_L 域)。Fab' 片段相当于具有与 CH1 域相连的铰链区的一部分的 Fab 片段。 $F(ab')_2$ 片段相当于两个通常在铰链区通过二硫键彼此共价相连的 Fab' 片段。

[0099] C_H 域定义了免疫球蛋白的同种型并赋予了各同种型不同的功能特征。例如, μ 恒定区能使 IgM 分子形成五聚体, α 恒定区能使 IgA 形成二聚体。

[0100] 免疫球蛋白分子的抗原特异性是由可变区即 V 区的氨基酸序列赋予的。因此,根据其抗原特异性,不同免疫球蛋白分子的 V 区可以明显不同。V 区的某些部分比其他部分更加保守,被称为框架区(FW 区)。相比而言, V 区的某些部分高度可变,被称为超变区。当 V_L 域和 V_H 域在免疫球蛋白分子中配对时,每个结构域的超变区连接起来形成超变环,所述超变环形成抗原结合位点。因此,超变环决定了免疫球蛋白的特异性,并且因为其表面与抗原互补而被称为互补决定区(CDR)。

[0101] V 区的更进一步的可变性是由编码免疫球蛋白 V 区的基因区段的组合可变性赋予的。免疫球蛋白基因包括多个胚系基因区段,所述胚系基因区段发生体细胞性重排以形成编码免疫球蛋白分子的重排的免疫球蛋白基因。 V_L 区是由 L 链 V 基因区段和 J 基因区段(连接区段)编码的。 V_H 区是由 H 链 V 基因区段、D 基因区段(多样性区段)和 J 基因区段(连接区段)编码的。

[0102] L 链和 H 链的 V 基因区段都含有基本的氨基酸序列可变性的三个区域。这类区域被分别称为 L 链 CDR1、CDR2 和 CDR3,以及 H 链 CDR1、CDR2 和 CDR3。不同 V_L 区之间的 L 链 CDR1 的长度会发生显著变化。例如,CDR1 的长度可以在约 7 个氨基酸至约 17 个氨基酸之间变化。相比之下,不同 V_L 区之间的 L 链 CDR2 和 CDR3 的长度通常是不变的。不同 V_H 区之间的 H 链 CDR3 的长度会发生显著变化。例如,CDR3 的长度可以在约 1 个氨基酸至约 20 个氨基酸之间变化。每个 H 和 L 链 CDR 区的侧翼均为 FW 区。

[0103] 免疫球蛋白分子的其他功能方面包括免疫球蛋白分子的效价、免疫球蛋白分子的亲和力和免疫球蛋白分子的亲合力。本文所用的亲和力是指在免疫球蛋白分子上的单个位点处免疫球蛋白分子与抗原结合(即单价 Fab 片段与单价抗原结合)的强度。亲和力不同于亲合力,亲合力是指免疫球蛋白与抗原结合强度的总和。免疫球蛋白结合的亲和力可以用本领域的标准技术来测量,例如竞争性结合技术、平衡透析或 BIAcore 法。本文所用的效价是指每个免疫球蛋白分子的不同抗原结合位点的数目(即每个抗体分子的抗原结合片段的抗原结合位点的数目)。例如,单价免疫球蛋白分子一次仅结合一个抗原,而二价免疫球蛋白分子一次能够结合两个或多个抗原,以此类推。本文包括选择性结合补体旁路中的蛋白的单价和二价抗体。

[0104] 在一个实施方案中,所述抗体是双特异或多特异抗体。双特异性(或多特异性)抗体能够结合两个(或多个)抗原,如同二价(或多价)抗体一样,但是此时所述抗原是不同的

抗原(即所述抗体具有双特异性或更多重的特异性)。例如,根据本发明的、选择性结合补体旁路中的蛋白的抗体(例如本文所述的抗因子 B 抗体)可以被构建为双特异抗体,其中第二抗原结合特异性是针对预期靶标的。因此本发明所包含的双特异抗体包括具有以下部分的抗体:(a)与补体旁路中的蛋白(例如因子 B)结合的第一部分(例如第一个抗原结合部分);和(b)与细胞表达的细胞表面分子结合的第二部分。在该实施方案中,所述第二部分可以与任何细胞表面分子结合。一种优选的细胞表面分子为受体或配体,这样所述抗体可以靶向特定类型的细胞或组织和/或靶向给予了该抗体的动物体内的特定位点。在一个实施方案中,所述第二抗原结合特异性是针对补体受体的。特别优选的补体受体包括但不限于 2 型补体受体(CR2)。例如美国专利 6,820,011 描述了选择性结合 CR2 并因此被用于本发明的该实施方案的抗体。

[0105] 在一个实施方案中,本发明的抗体包括人源化抗体。人源化抗体是具有来自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,所述分子的其余免疫球蛋白来源部分来自人免疫球蛋白。所述抗原结合位点可以包括融合到人恒定域上的完整的可变区,或仅包括移植到人可变域中的适当的人框架区上的互补决定区(CDR)。人源化抗体可以通过例如下述的方法来制备:将所述抗体可变域建模,并且利用基因工程技术(例如,如下所述的 CDR 移植)来制备所述抗体。关于各种用于人源化抗体生产的技术的说明请查阅例如 Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55; Whittle et al. (1987) Prot. Eng. 1:499-505; Co et al. (1990) J. Immunol. 148:1149-1154; Co et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869-2873; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:4285-4289; Routledge et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21:2717-2725 和公开号为 W091/09967、W091/09968 和 W092/113831 的 PCT 申请。

[0106] 本发明的分离的抗体可包括含这类抗体的血清或已经纯化到各种程度的抗体。本发明的全部抗体都可以是多克隆或单克隆的。或者,本发明也可以采用全部抗体的功能等价物,例如截短或缺失了一个或多个抗体结构域的抗原结合片段(例如 Fv、Fab、Fab' 或 F(ab)2 片段);以及遗传工程抗体或其抗原结合片段,包括单链抗体、人源化抗体(如上所述)、与不只一个表位结合的抗体(例如双特异抗体)或与一个或多个不同抗原结合的抗体(例如双特异或多特异抗体)。

[0107] 本发明的遗传工程抗体包括那些通过标准的重组 DNA 技术制备抗体,所述重组 DNA 技术包括对编码抗体可变区和/或恒定区的 DNA 的操作和重表达。具体的实例包括嵌合抗体和 CDR 移植抗体(及其抗原结合片段),在嵌合抗体中,与抗体的其余部分相比,所述抗体的 V_H 和/或 V_L 域来自于不同来源,在 CDR 移植抗体中,至少一个 CDR 序列和任选地至少一个可变区框架氨基酸来自一个来源,而可变区和恒定区(视情况而定)的其余部分来自一个不同的来源。例如,欧洲专利申请:EP-A0194276、EP-A0239400、EP-A0451216 和 EP-A0460617 中描述了嵌合抗体和 CDR 移植抗体的构建。

[0108] 在一个实施方案中,根据本发明制备的嵌合抗体包括与补体旁路的蛋白质(例如因子 B)结合的抗体可变域以及与这些结构域融合、作为第二靶向部分的蛋白质。例如,所述靶向部分可以包括与所要靶向的细胞或组织相关或与动物体内的特定系统相关的蛋白质。例如,所述靶向部分可以是选择素或补体受体的一部分。本发明这一方面所用的优选的补体受体包括 2 型补体受体(CR2)。美国专利 No. 6,820,011 详细描述了 CR2 及其部分在融合

蛋白或嵌合蛋白中的用途(例如,作为递送系统)。

[0109] 通常,在抗体制备中,将适合的实验动物(例如但不限于兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、小鼠、大鼠或鸡)暴露于所需抗体所针对的抗原。通常,用注射到动物体内的有效量的抗原来免疫动物。有效量的抗原是指用于诱导所述动物生成抗体所需的量。然后在一段预定的时间内,允许所述动物的免疫系统进行应答。重复免疫接种过程直至发现所述免疫系统产生针对所述抗原的抗体。为获得抗原特异性多克隆抗体,从含有所需抗体的动物身上采集血清(或者如果是鸡,可以从卵采集抗体)。这类血清可被用作试剂。例如,可以通过用硫酸铵处理所述血清来从血清(或卵)中进一步纯化多克隆抗体。

[0110] 单克隆抗体可以按照Kohler and Milstein(Nature256:495-497, 1975)的方法来制备。例如,从免疫过的动物的脾(或任何适合的组织)回收B淋巴细胞,然后将其与骨髓瘤细胞融合以获得能够在适合的培养基中持续生长的杂交瘤细胞群。产生所需抗体的杂交瘤可通过测试由杂交瘤产生的抗体与所需抗原结合的能力来选择。

[0111] 制备本发明的抗体的优选方法包括:(a)给予动物有效量的蛋白质或肽(例如因子B蛋白或包括其结构域的肽)以产生抗体,和(b)回收抗体。在另一种方法中,本发明的抗体是通过重组生产的。例如,一旦获得表达本发明的抗体的细胞系(例如杂交瘤),就可能从中克隆cDNA并鉴定编码所需抗体的可变区基因,包括编码CDR的序列。由此,可通过制备一种或多种复制表达载体并且转化/转染适合的宿主细胞来制备本发明的抗体和抗原结合片段,在所述宿主细胞中将会进行抗体生产,所述复制表达载体至少包含编码抗体重链或轻链可变域的DNA序列和任选的其它编码所需重链或轻链的其余部分的DNA序列。适合的表达宿主包括细菌(例如大肠埃希氏(E. coli)菌株)、真菌(特别是酵母,例如毕赤酵母(Pichia)、酵母(Saccharomyces)或克鲁维酵母(Kluyveromyces)属的成员)和哺乳动物细胞系(例如非生产型骨髓瘤细胞系,如小鼠NS0系或CHO细胞)。为了获得有效的转录和翻译,每个载体中的DNA序列都应该包括适当的调节序列,特别是可操作地连接所述可变域序列的前导序列和启动子。以这种方式产生抗体的具体的方法通常是众所周知的并且是被常规使用的。例如,Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)描述了基本的分子生物学方法;按照Sanger et al. (PNAS74, 5463, (1977))和Amersham国际plc测序手册中所述内容进行DNA测序;按照Kramer et al. (Nucl. Acids Res. 12, 9441, (1984))和Anglian Biotechnology Ltd.的手册中的方法进行定向诱变。此外,有许多包括专利说明书在内的出版物,它们详细描述了适合通过操作DNA、构建表达载体和转化合适的细胞来制备抗体的技术,例如,如Mountain A和Adair, J R在Biotechnology and Genetic Engineering Reviews(ed. Tombs, M P, 10, Chapter1, 1992, Intercept, Andover, UK)中以及前述欧洲专利申请中所综述的那样。

[0112] 采用例如噬菌体展示技术(参见例如US5969108、US5565332、US5871907、US5858657)的替代方法或US5627052所选择的淋巴细胞抗体法也可被用于生产本发明的抗体和/或抗原片段,这些对于本领域技术人员来说是极其显而易见的。

[0113] 本发明也涉及非抗体多肽的用途,所述非抗体多肽有时被称为抗原结合配偶体或抗原结合多肽,它被设计来选择性结合本发明的蛋白质并且中和或抑制该蛋白。Beste et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 96:1898-1903, 1999)中给出了具有规定的配体特异性的这类多肽设计的实例,其全文以引用的方式纳入本说明书。

[0114] 本发明也包括用于减轻 TBI 或 SCI 相关的生理损害的制剂或组合物。所述制剂包括：(a) 任何一种或多种本文所述的补体旁路的抑制剂(例如本文所述的抗因子 B 抗体);和 (b) 至少一种可药用的载体。

[0115] 在一个实施方案中,所述制剂或化合物可以包括一种或多种附加试剂,例如另一种适合于治疗至少一种 TBI 的症状或 TBI 相关生理损害的试剂(例如渗透性药物、镇静药、镇痛药、肌肉松弛药、巴比妥酸盐等)。此外,可以将所述制剂与另一种用于治疗或改善 TBI 相关损害的疗法或方案共同给予患者。这类疗法或方案包括但不限于:通过手术清除颅内血肿来减少大面积损伤,用渗透性药物(例如甘露醇)减轻脑肿胀,通过脑室内导管来治疗性地排出脑脊液(CSF),实现并维持足够的气体交换和循环稳定性,预防低氧血和高碳酸血症,重复进行 CT 扫描以检测延缓的继发性颅内病理状态,深度镇静和镇痛以避免应激和疼痛,实现并维持最适的 CPP (>70mmHg) 和脑氧平衡,避免体温过高(<38°C),预防高血糖症和低钠血症,防止常规进行的头部抬高,预防应激性溃疡并维持肠粘膜完整性,预防并发因素(例如肺炎或脑膜炎),颅内压(ICP)靶向疗法(例如深度镇静、深度镇痛、深度肌肉放松,通过脑室内导管来排出 CSF,在某些情况下适度增加通气,渗透疗法,适度降温($\pm 34^{\circ}\text{C}$)和/或巴比妥酸盐昏迷)和/或用气体(CO₂)进行的神经炎症弱化。各种用于 TBI 的疗法是本领域公知的并且例如在 Royo et al., 2003, Current Opin. Pharmacol. 3:27-32; Dutton and McCunn, 2003, Current Opin. Crit. Care 9:503-509; Elf et al., 2003, Eur. J. Trauma 29:74-80; Ghajar et al., 2000, Lancet 356:923-929 中有所描述。

[0116] 在另一个实施方案中,所述制剂或组合物可以包括一种或多种附加试剂,例如另一种适合于治疗至少一种 SCI 的症状或 SCI 相关生理损害的试剂(例如类固醇,如甲泼尼龙)。此外,可以将所述制剂与另一种用于治疗或改善 SCI 相关损害的疗法或方案共同给予患者。这类疗法或方案包括但不限于:脊柱固定、减压手术、手术稳定椎骨、手术复位椎骨、牵引。各种用于 SCI 的疗法是本领域公知的并且在例如 Ramer et al., 2005, Spinal Cord 43(3):134-61 中有所描述。

[0117] 根据本发明,“可药用载体”包括可药用的赋形剂和/或可药用的送递载体,它们适用于将制剂或组合物给予到适合的体内位点。适合的体内位点优选地是其中的补体旁路可被抑制的任何位点,但是在一个优选的实施方案中,所述适合的体内位点在患者的脑组织中,所述患者具有 TBI 或 SCI 相关生理损害,或有发展出 TBI 或 SCI 相关生理损害的风险。优选的可药用载体能将本发明的制剂中所用的试剂维持于这样一种形式,即当所述试剂到达患者体内的靶位点时,所述试剂能够作用于其靶标上(例如作为补体旁路组成部分的蛋白质),优选地对所述患者产生疗效。

[0118] 本发明的适合的赋形剂包括将运输或帮助运输组合物到细胞或组织处,但不是特异性靶向到该细胞或组织处的赋形剂或配方(本文中也称为非靶向载体)。可药用赋形剂的实例包括但不限于水、磷酸盐缓冲盐水、Ringer's 溶液、葡萄糖溶液、含血清的溶液、Hank's 溶液、其他水性生理平衡溶液、油类、酯类和二醇类。水性载体可以包含例如通过增强化学稳定性和等渗性来接近接受者的生理状况所需的适合的辅助物质。适合辅助物质包括,例如乙酸钠、氯化钠、乳酸钠、氯化钾、氯化钙和其它用于产生磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液和碳酸氢盐缓冲液的物质。辅助物质也可以包括防腐剂例如硫柳汞、间甲酚或邻甲酚、甲醛和苯甲醇(benzol alcohol)。本发明的制剂可以通过常规方法来灭菌并且/或者可以进行冷冻

干燥。

[0119] 一类可药用载体包括一种能将本发明的组合物缓慢释放到动物体内的控释制剂。本文所用的控释制剂包括置于控释载体中的本发明的试剂。适合控释载体包括但不限于生物相容性聚合物、其他的聚合基质、胶囊、微胶囊、微粒、推注制品(bolus preparation)、渗透泵、扩散装置、脂质体、脂质球(liposphere)和透皮给药系统。其它适合的载体包括能结合或掺有延长所要递送的试剂的半衰期的试剂的任何载体。这类载体可以包括任何适合的蛋白质载体或甚至是当递送到体内时能延长蛋白质半衰期的融合蛋白区段。适合的递送载体在上文中已经描述过,包括但不限于脂质体、病毒载体或其它递送载体,包括核酶。天然含脂质的递送载体包括细胞和细胞膜。人工的含脂质的递送载体包括脂质体和微团。可以对本发明的递送载体进行修饰以使其靶向患者体内特定的位点,从而使抑制剂靶向该位点并在该位点利用抑制剂。适合的修饰包括对所述递送载体的脂质部分的化学分子进行操作和/或在所述载体中引入能特异性地将递送载体靶向优选位点(例如优选的细胞类型)的靶向试剂。其他适合的递送载体包括金颗粒、聚-L-赖氨酸/DNA-分子缀合物和人工染色体。

[0120] 能够打靶的可药用载体被称为“靶向递送载体”。本发明的靶向递送载体能够将制剂(包括抑制剂)递送到患者体内的靶位点。“靶位点”是指患者体内的所要递送治疗制剂的位点。例如,靶位点可以通过直接注射或使用脂质体、病毒载体或其它递送载体(包括核酶)递送所靶向的任何细胞或组织。可以对本发明的递送载体进行修饰以使其靶向动物体内特定的位点,从而使核酸分子靶向该位点并在该位点利用核酸分子。适合的修饰包括对所述递送载体的脂质部分的化学分子进行操作和/或在所述载体中引入能特异性地使递送载体靶向优选位点例如优选的细胞或组织类型(例如靶向脑或中枢神经系统)的化合物。具体地,靶向是指通过载体中的化合物与细胞表面分子之间的相互作用使所述递送载体与特定的细胞结合。适合的靶向性化合物包括能够在特定位点选择性(即特异性)地结合另一种分子的配体。这类配体的实例包括抗体、抗原、受体和受体配体。特别有用的实例包括任何与补体途径相关的配体(例如 CR2、C3、C3d、C3dg、iC3b、C3b)或任何与所要治疗的动物的体内细胞类型、组织类型或位点相关的配体(例如选择素)。

[0121] 对所述递送载体的脂质部分的化学分子进行操作可以调整所述递送载体的胞外或胞内靶向性。例如,可以向脂质体的脂质配方中加入能改变该脂质体脂双层电荷的化学物质,使得所述脂质体能与具有特定电荷特征的特定细胞融合。在一个实施方案中,靶向递送载体可以是使得化合物可以穿过血脑屏障的制剂。

[0122] 一种可用于各种给药途径和试剂的递送载体为脂质体。脂质体能够在动物体内维持稳定达足够长的时间,以将本发明所述的核酸分子递送到动物体内的优选位点。本发明的脂质体含有能将核酸分子或其他化合物递送到动物体内特定或选定位点的脂质组合物。根据本发明的脂质体包括能够与靶细胞的质膜融合以将核酸分子递送到细胞中的脂质组合物。本发明使用的适合的脂质体包括任何脂质体。本发明优选的脂质体包括那些通常用于例如本领域技术人员已知的基因递送方法的脂质体。更优选的脂质体包括含有聚阳离子脂质组合物的脂质体和/或具有与聚乙二醇缀合的胆固醇骨架的脂质体。可以利用本领域的标准方法将脂质体与本发明的核酸分子或抑制剂混合。

[0123] 另一种递送载体包括病毒载体。病毒载体含有本发明的方法中所用的分离的核酸分子,其中所述核酸分子被包裹于能使 DNA 进入细胞的病毒外壳中。可以使用许多病毒载

体,包括但不限于基于甲病毒、痘病毒、腺病毒、疱疹病毒、慢病毒、腺伴随病毒和反转录病毒的病毒载体。

[0124] 本发明的试剂和制剂可以被给予到任何动物或患者,且优选给予到人。根据本发明,试剂或制剂的给药可用来抑制 TBI 或 SCI 相关生理损害的任何症状,或者类似的或相关的病症。适合于本发明方法的候选患者包括但不限于具有由于损伤(包括外伤性损伤)或疾病导致的对脑或脊髓的生理损害及与该损害相关的病症的患者,或者有发展出(例如可能发展出或预计会发展出)这类损害或病症风险的患者。

[0125] 根据本发明,本领域技术人员可以确定给予试剂或含所述试剂的组合物的可接受的方案,包括给药途径和所要给予动物的试剂的有效量。本发明的试剂或组合物可以在体内或活体外给药。适合的体内给药途径包括但不限于口、鼻、吸入、局部、气管内、透皮、直肠、脑(例如颅内)、脊柱(例如脊柱内或脊髓的硬膜外隙)和肠胃外途径。优选的肠胃外途径可以包括但不限于皮下、真皮内、静脉内、肌内和腹膜内途径。优选的局部途径包括经气雾剂(即喷雾)吸入或局部表面给予到动物皮肤上。优选地,试剂是通过全身途径(例如腹膜内、静脉内)给予的,特别优选静脉内给药,或者是通过脑、脊髓或脊髓硬膜外隙给予的。对于外伤性脑损伤,优选通过静脉内给药给予或给予到脑。对于脊髓损伤,优选通过静脉内给药、脊髓给药给予或者给予到脊髓的硬膜外隙。活体外是指部分给药步骤是在患者体外进行的。

[0126] 将试剂和组合物给予到脑和中枢神经系统的技术包括但不限于静脉内给药、腹膜内给药、通过开放血脑屏障的动脉内送递、利用对流增强型送递方法将药物持续注入脑中、植入、鞘内输注、脑室内给药、间质给药和脊柱内给药。静脉内、腹膜内、肌内和脊柱内给药可利用本领域中的标准方法来进行。气雾剂(吸入)送递可利用本领域中的标准方法来进行(例如,参见 Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA189:11277-11281, 1992, 其全文以引用的方式纳入本说明书)。适用于气雾剂送递的载体如上所述。用于送递雾化制剂的装置包括但不限于压力计量吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)和计量溶液装置(MSI),并且包括喷雾器和吸入器在内的装置。可通过将本发明的治疗组合物与能够经受住动物消化道内消化酶降解的载体混合来进行口服给药。这类载体的实例包括塑料胶囊或片剂,例如本领域已知的那些载体。直接注射技术特别适用于将重组核酸分子给予到可通过外科手术达到的细胞或组织,特别是在身体表面或接近身体表面。在靶细胞区域的附近给予组合物是指将所述组合物注射到距靶细胞或组织几厘米(优选几毫米)处。

[0127] 本发明所公开的各种给药方法和送递载体已经被证明在将核酸分子送递到靶细胞或组织时是有效的,藉此所述核酸分子可转染所述细胞并且被表达。在许多研究中,异源基因的成功送递和表达是通过在优选的细胞类型中和/或使用本发明的优选的送递载体和给药途径来实现的。可以通过给予编码核酸序列的病毒载体来将很多核酸序列送递到各种靶组织中。(例如,参见各种反转录病毒的实例;Blaese et al., 1995, Science270:475-480;Bordignon et al., 1995, Science270:470-475)、鼻内给药(CFTR-腺伴随病毒载体)、冠状动脉内给药(参见上文的腺病毒载体和日本血凝病毒)、静脉内给药(腺伴随病毒载体;Koeberl et al., 1997, Proc Natl Acad Sci USA94:1426-1431)。Millecamps 等人报道了利用位于转基因的启动子(磷酸甘油酸启动子)上游的神经元限制性增强子元件来将腺病毒载体靶向到神经元。可分别通过肌内和脑内给药将这类载体给予小鼠和大鼠,

由此实现成功的神经元特异性转染和转基因的体内表达(Millecamps et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:865-869)。Bennett 等人报导了使用腺伴随病毒载体通过视网膜下注射将基因送递到神经视网膜并在体内表达超过一年(Bennett, 1999, 同上文)。

[0128] 给予动物的抑制剂的合适单次剂量是当在适合的时间段内进行一次或多次给药时,能够在动物体内减轻或预防由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的至少一种症状的剂量。优选的试剂(包括本文所述的方法中使用的蛋白质、小分子和抗体)单次剂量包括约 0.01 微克至约 10 毫克/千克动物体重。更优选的试剂单次剂量包括约 1 微克至约 10 毫克/千克动物体重。甚至更优选的试剂单次剂量包括约 5 微克至约 7 毫克/千克动物体重。甚至更优选的试剂单次剂量包括约 10 微克至约 5 毫克/千克动物体重。如果试剂是以气雾剂形式送递的,则特别优选的试剂单次剂量包括约 0.1 毫克至约 5 毫克/千克动物体重。如果所述试剂是肠胃外送递的,则另一个特别优选的试剂单次剂量包括约 0.1 微克至约 10 微克/千克动物体重。

[0129] 在一个实施方案中,本发明的核酸:脂质体复合物的合适的单次剂量为每千克所要给予所述复合物的患者体重约 0.1 μ g 至约 100 μ g。在另一个实施方案中,合适的单次剂量为每千克体重约 1 μ g 至约 10 μ g。在另一个实施方案中,核酸:脂质体复合物的合适的单次剂量为至少约 0.1 μ g 核酸、更优选至少约 1 μ g 核酸、甚至更优选至少约 10 μ g 核酸、甚至更优选至少约 50 μ g 核酸、甚至更优选至少约 100 μ g 核酸。

[0130] 优选的抗体单次剂量包括约 1ng 至约不到 1mg/千克动物体重。更优选的抗体单次剂量包括约 20ng 至约 600 μ g/千克动物体重。甚至更优选的抗体单次剂量(特别是当所述抗体制剂是通过喷雾法送递时)包括约 20ng 至约 600 μ g/千克动物体重,更优选约 20ng 至约 500 μ g/千克动物体重、更优选约 20ng 至约 400 μ g/千克动物体重、更优选约 20ng 至约 300 μ g/千克动物体重、更优选约 20ng 至约 200 μ g/千克动物体重、更优选约 20ng 至约 100 μ g/千克动物体重、更优选约 20ng 至约 50 μ g/千克动物体重。

[0131] 另一个优选的抗体单次剂量(特别是当所述抗体制剂是通过喷雾法送递时)包括约 200ng 至约 600 μ g/千克动物体,更优选约 200ng 至约 500 μ g/千克动物体重、更优选约 200ng 至约 400 μ g/千克动物体重、更优选约 200ng 至约 300 μ g/千克动物体重、更优选约 200ng 至约 200 μ g/千克动物体重、更优选约 200ng 至约 100 μ g/千克动物体重、更优选约 200ng 至约 50 μ g/千克动物体重。

[0132] 另一个优选的抗体单次剂量(特别是当所述抗体制剂是通过吸入器直接吸入时)包括约 2ng 至约 100 μ g/千克动物体重,更优选约 2ng 至约 50 μ g/千克动物体重、更优选约 2ng 至约 10 μ g/千克动物体重、更优选约 2ng 至约 5 μ g/千克动物体重、更优选约 2ng 至约 1 μ g/千克动物体重、更优选约 2ng 至约 0.5 μ g/千克动物体重、更优选约 2ng 至约 0.25 μ g/千克动物体重、更优选约 2ng 至约 0.1 μ g/千克动物体重。

[0133] 在另一个实施方案中,所述抗体的给药剂量为每毫升制剂少于约 500 μ g 抗体、优选每毫升制剂少于约 250 μ g 抗体、更优选每毫升制剂少于约 100 μ g 抗体、更优选每毫升制剂少于约 50 μ g 抗体、更优选每毫升制剂少于约 40 μ g 抗体、更优选每毫升制剂少于约 30 μ g 抗体、更优选每毫升制剂少于约 20 μ g 抗体、更优选每毫升制剂少于约 10 μ g 抗体、甚至更优选每毫升制剂约 5 μ g 抗体至约 10 μ g 抗体。

[0134] 根据本发明的方法,给予动物的抑制 TBI 或 SCI 所导致的生理损害的试剂的有效

量为这样一个量,该量能够减少由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的至少一个症状或指征,或者能够加强 TBI 或 SCI 恢复,且不会对动物有毒性。对动物有毒性的量包括任何会对动物的结构或功能造成损害的量(即有毒的)。

[0135] 在本发明的一个实施方案中,在遭受 TBI 或 SCI 的动物体内,给予动物的试剂的有效量是指与给予所述试剂之前相比或与不给予所述试剂相比,在动物体内显著减少由 TBI 或 SCI 导致的生理损害的至少一种症状或指征的量。在另一个实施方案中,给予动物的试剂的有效量是指与一群遭受基本类似的 TBI 或 SCI 而没有给予所述试剂的动物的症状水平相比,在动物体内显著减少由 TBI 或 SCI 导致的损害的至少一种症状或指征的量。优选地,甚至在损害的生理症状发作之后给予所述试剂,该试剂也能够在动物体内减少由 TBI(例如脑损害)或 SCI(例如脊髓损害)导致的生理损害的至少一种症状或指征。最优选地,试剂的有效量是指在患者体内能将 TBI 或 SCI 导致的损害的一种或多种症状或指征减少到不再被检测到的程度的量。在一个实施方案中,所述试剂的有效量是指促进患者从 TBI 或 SCI 中恢复的量,这可以通过生理损害的症状或指征的停止或逆转来测定,或者通过患者体内神经或相关功能的可测量或可检测生物评分、数值或量度的改善来测定。

[0136] 在一个优选的实施方案中,本发明的试剂的适合剂量是指与不给予所述试剂的情况相比,能有效抑制如本文所述的补体旁路中的至少一种蛋白质(例如因子 B、因子 D 或备解素)的表达或生物活性的剂量。测定蛋白质表达或生物活性的方法如上文所述。在另一个实施方案中,本发明的试剂的适合剂量是指显著抑制本发明的补体旁路的剂量。补体的激活和对其的抑制可以使用本领域公知的技术/测定法来测量。例如,技术人员可以如在实施例中所描述的那样在酵母聚糖 A 颗粒上进行 C3 沉积的体外分析。技术人员也可以测试所述试剂抑制人血清裂解未致敏红细胞的能力。基于这些测定法由体外结果外推出体内剂量是在本领域技术人员能力范围之内的。

[0137] 本领域技术人员应能够根据 TBI 或 SCI 的程度、与该损伤相关的预期或实测生理损害以及个体患者对治疗的反应来确定所要给予动物的试剂的剂量数。用于诊断 TBI 和 SCI(包括所述病症的严重程度)的方法如上文所述并且在本领域中是已知的。此外,临床医生应能够确定为在动物体内有效地减少 TBI 或 SCI 导致的或相关的一种或多种症状而进行所述试剂送递的适当时机。优选地,所述试剂在 48 小时之内送递,更优选 36 小时、更优选 24 小时、更优选在 12 小时内、更优选在 6 小时、5 小时、4 小时、3 小时、2 小时或 1 小时内,或者甚至是在导致 TBI 或 SCI 的事件发生后的数分钟内。在一个实施方案中,患者、临床医生或其他人一旦意识到该患者已遭受 TBI 或 SCI 就(即立即)给予所述试剂。在另一个实施方案中,当首次出现可能与 TBI 或 SCI 相关的脑或神经损害的症状的体征时就给予所述试剂,优选在一种或多种症状出现至少 2 小时内,更优选在至少 1 小时内、更优选在至少 30 分钟内、更优选在至少 10 分钟内、更优选在一种或多种症状出现至少 5 分钟内。TBI 或 SCI 相关生理损害的症状以及用于测量或检测这类症状的方法在上文中已有详细描述。优选地,一直进行这种给药直至出现生理损害减轻或生理损害的潜在症状减少的体征,然后根据需要给药至症状消失或停止。

[0138] 本发明的方法可以被用于任何动物,特别是任何脊椎动物哺乳纲(即哺乳动物)的动物,包括但不限于灵长类、啮齿类、家畜和驯养的宠物。使用本发明的方法治疗的优选的哺乳动物为人。

[0139] 提供以下实施例是出于说明的目的而并非意在限制本发明的范围。

[0140] 实施例

[0141] 实施例 1

[0142] 下列实施例描述了在外伤性脑损伤(TBI)后,给予的补体抑制剂 Crry-Ig 对生理功能的疗效。

[0143] Crry-Ig 是补体受体相关蛋白 γ (Crry)与免疫球蛋白 Fc 分子的融合蛋白。Crry 是人衰变加速因子(CD55)和膜辅因子蛋白(CD46)的功能同源物,并且会抑制 C3 补体转换酶。因此,Crry 是经典补体途径和补体旁路的抑制剂。

[0144] 在小鼠的闭合性头部外伤的标准化模型(Chen et al., J. Neurotrauma1996)中,与仅注射载体的对照小鼠相比,损伤后全身给予 1mg Crry-Ig 会使得 TBI 后 24 小时内神经恢复明显改善(图 6),该损伤后 Crry-Ig 的全身给药对应于该模型系统中创伤后 1-24 小时内由于血脑屏障受损所出现的治疗“有效时间窗”。在这一实验中,创伤后神经功能缺损的程度是由两名独立的研究者按盲法通过标准的 10 分制神经功能损伤程度评分(Neurological Severity Score, NSS)来评估的。此外,与注射载体的对照相比,创伤后 1 小时通过 i. p. 注射 1mg Crry-Ig 的头部损伤的小鼠表现出明显的体重下降(图 7),这说明 Crry-Ig 导致的补体抑制使小鼠避免了炎症诱导的创伤后异化状态。

[0145] 这些结果证明在 C3 补体转化酶水平上抑制所述补体途径会抑制 TBI 相关的生理损害。

[0146] 实施例 2

[0147] 下述实施例说明了因子 B 单克隆抗体能减轻外伤性脑损伤(TBI)相关的脑损害。

[0148] 初步滴定研究表明在体内,在重 25-35g 的 C57BL/6 小鼠体内通过腹膜内(i. p.)注射 2mg mAb1379 (因子 B 单克隆抗体即抗 fB)会使得补体旁路活性完全受到抑制,抑制作用持续 48 小时。采用如下两个实验组在 C57BL/6 小鼠内(Chen et al., J. Neurotrauma1996)进行实验性闭合头部外伤后的抗 fB 抑制研究:一组接受 2mg mAb1379,在 t=1h、24h 或 72h 时 i. p. 注射;第二组只接受载体介质,在相同的时间点注射。结果表明,基于创伤后 24 小时内明显下降的 10 分制神经功能损伤程度评分(NSS),与注射载体的对照动物相比,在抗 fB (mAb1379)组中补体旁路的抑制有明显的神经保护作用(表 3;图 8)。这一结果证明对补体旁路的选择性抑制作用能减轻由 TBI 导致的生理损害。

[0149] 表 3

[0150]

神经功能损伤程度评分 (NSS)	0 (最好) -10 (最差)	
	<u>NSS 4h</u>	<u>NSS 24h</u>
创伤载体 (n=20) *	6	4
创伤抗因子 B (n=8) *	3.5	2.5

*中值

[0151] 实施例 3

[0152] 下述实施例表明因子 B 单克隆抗体能减轻脊髓损伤(SCI)相关的脑损害。

[0153] 本研究使用 6-8 周龄、重 16-20g (针对所有小鼠)的野生型雌性 C57BL/6 小鼠

(Charles River, MD)和雌性 fB^{-/-} 小鼠。不限量地给动物提供水和食物并将其关在通气的树脂玻璃(Plexiglas) 笼子里(四只小鼠 / 每个笼子),用无病原屏障设备制造 12/12 小时的光 - 暗周期循环并按照美国卫生与公共服务部的实验动物管理和使用 NIH (美国国立卫生研究院, Bethesda, MD) 指南进行饲养。小鼠在实验前至少适应一周。

[0154] 动物手术和术后操作由南卡罗莱纳医科大学的动物研究委员会批准。手术操作是在无菌条件下进行的。使用用于诱导脊髓损伤(SCI)的重物坠击装置来在小鼠体内制造脊髓挫伤(Pannu et al. (2005) J. Neuroscience Research 79:340-350)。简言之,通过腹膜内(i. p.)注射氯胺酮(75mg/kg)和赛拉嗪(16mg/kg)对小鼠进行麻醉。对小鼠背部背侧进行刮毛并用碘化溶液擦洗。在手术过程中通过在动物身体下放置 37°C 的加热毯来维持体温。在 T9 至 T13 节段之间的皮肤中线进行切口。在 T12 节段处进行椎板切除术,保持硬膜完整。用立体定位装置固定脊柱并通过从 3cm 高处向暴露出的硬膜上坠落 5g 的重物(15g-cm 力)来诱导损伤。假手术动物仅进行椎板切除术。损伤后,闭合肌肉层并缝合切口。将小鼠置于加热垫上。术前或术后均没有使用预防性抗生素或镇痛药,目的是防止它们与 SCI 的实验性疗法之间可能的相互作用。每天手动挤压膀胱两次直至恢复足够的自发性排泄。

[0155] 所有的动物都被包括在功能恢复研究中。每周由不知情的观察者采用后肢运动功能评分来评估实验小鼠的后肢功能(Shuhei K J. of Neuropathology and Experimental Neurology (2004) 64-72)。评分范围从 0 至 5,分数如下:0:无后肢运动;1:任何后肢关节(髌、膝盖或踝)几乎没有可察觉的运动;2:一只或两只后肢中一个或多个后肢关节(髌、膝盖或踝)敏捷地运动,但不协调;3:后肢交替迈步和推进性(propulsive)运动,但无法负重;4:可以负重行走,但有缺陷;5:正常行走。

[0156] 图 9 示出了研究给予因子 B 单克隆抗体对脊髓损伤功能恢复的作用的研究结果。在上述 SCI 鼠类模型中, C57BL/6 小鼠在损伤后 1 小时和 12 小时时静脉内注射了 1mg/10g 抗因子 B (mAb1379) (各组数目, n=8)。如上所述,创伤后的 21 天内每天评估一次功能恢复情况。在该时间段内也对假手术处理小鼠、具有实验性 SCI 的未治疗小鼠和具有实验性 SCI 的因子 B (-/-) 小鼠进行评估。如图 9 所示,与具有实验性脊髓损伤的未治疗小鼠相比,因子 B (-/-) 小鼠和接受了抗因子 B 的小鼠在所述 21 天内的每一天的时间点都有显著(p<0.01)改善的功能恢复评分。这些结果证明在 SCI 模型中,对补体旁路的选择性抑制作用足以提供显著的疗效。

[0157] 实施例 4

[0158] 下述实施例证明补体激活的旁路途径在 TBI 病理生理学中起重要作用。

[0159] 材料与方法

[0160] 因子 B^{-/-} 小鼠。所述因子 B 缺陷型(fB^{-/-}) 基因敲除小鼠之前已经被表征过,并且被证明完全丧失功能性补体旁路 [58]。它们最初是使用 Sv129 胚胎干细胞生成的,并且在 F1 群体繁殖前与 C57BL/6 小鼠杂交。然后将它们与纯种 C57BL/6 回交 10 代以上,发现它们与 C57BL/6 小鼠基本上无差别 [34]。敲除小鼠和野生型同窝出生小鼠(fB^{+/+}) 在实验前适应数周,并且在整个研究过程中保持实验动物不受外部影响。让它们在如下条件下饲养:选择性无病原(SPF) 环境、标准温度条件(21°C)、标准湿度条件(60%)、标准光暗周期循环(12:12 小时)、不限量提供食物和水。这一研究中仅使用雄性小鼠,目的是避免与补体活性水平相关的 [59] 和对脑损伤的敏感性相关的性别倾向,所

述敏感性似乎明显受雌性生殖激素影响 [60, 61]。所有的实验都是按照欧洲实验动物科学学会联合会 (FELASA) 的标准进行的, 并且得到动物管理委员会的批准 (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, Germany, No. G0099/03 and No. G0308/04)。

[0161] 脑损伤模型。如先前所描述的 [13, 38, 62-64], 使用标准的重物坠击装置, 对 C57BL/6 品系的敲除 (fB^{-/-}) 小鼠和野生型同窝出生小鼠 (fB^{+/+}) 进行实验性闭合头部损伤 (每组和每个时间点均为 n=6)。简言之, 在异氟烷麻醉诱导后, 通过中线纵向头皮切口暴露出颅骨。从 2cm 高处向固定的颅骨上坠落 333g 的重物, 对左半球造成局灶性钝器损伤。创伤后, 用 100% 的氧气对所述小鼠进行氧合支持直至完全苏醒, 然后将其放回笼中。在既定的时间点 (t=4 小时、24 小时和 7 天) 将小鼠无痛致死并取出脑半球进行免疫组织化学、TUNEL 组织化学和 SDS-PAGE/ 蛋白质印迹分析。此外, 收集血清样品以便通过 ELISA 和 Bcl-2 蛋白质印迹测定补体过敏毒素 C5a 的水平 (参加下文)。

[0162] 将假手术小鼠置于与创伤组同样的条件下并且进行相同的操作 (麻醉和头皮切口), 但不进行头部损伤。

[0163] 用于小鼠 C5a 的 ELISA。为了测定头部损伤的和正常的 C57BL/6 对照小鼠的血清样品中的补体过敏毒素 C5a 的水平, 使用了 Dr. P. A. Ward 实验室 (Ann Arbor, MI, USA) 开发的一种 ELISA。简言之, 将 ELISA 板 (Immulon4HBX, Thermo Labsystems, Milford, MA, USA) 用纯化的单克隆抗小鼠 C5a IgG (5 μ g/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 包被。在用 1% 的溶于含 0.05% TWEEN20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 的 PBS (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 的牛奶 (Roth, Karlsruhe, Germany) 封闭非特异性结合位点后, 将所述板用 100ml 1:20 稀释 (用 0.1% 的溶于含 0.05% TWEEN 的 PBS 的牛奶稀释) 的血清和用于建立标准曲线的确定浓度的鼠重组小鼠 C5a 包被。在孵育及随后的洗涤步骤后, 加入 500ng/ml 的生物素化的单克隆抗小鼠 C5a 抗体 (BD Pharmingen), 然后进行洗涤, 并用 400ng/ml 的链亲和素-过氧化物酶 (Sigma) 孵育。为进行比色反应, 加入底物 (同时溶于 0.05M 磷酸盐柠檬酸盐缓冲液的 0.4mg/ml OPD 和 0.4mg/ml 脲过氧化氢; Sigma), 并且用 3M 硫酸终止该显色反应。在 490nm 处读取吸光度 (“SpectraMax190” 读数器, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)。所有的样品都在两个孔中进行分析并且根据两次样品分析的平均值计算结果。标准曲线从 50ng/ml 至 0.1ng/ml 是线性的, 0.1ng/ml 代表了该测定法检测的下限。

[0164] 蛋白质印迹。通过蛋白质印迹分析对所有本研究中所用的小鼠的血清中作为内部质量控制的因子 B 的存在情况进行筛选。在 fB^{-/-} 和 fB^{+/+} 小鼠体内头部损伤或假手术操作后第 4 小时、第 24 小时和第 7 天, 测定匀浆的小鼠脑和相应时间点的血清样品中线粒体抗凋亡介质 Bcl-2 和凋亡前 Fas 受体的蛋白质水平。蛋白质印迹技术先前已有描述 [32]。简言之, 在麻醉下取出小鼠的脑, 并分离为左半球和右半球, 立即用 Ultra Turrax **Homogenizer**[®] (IKA Werke, Staufen, Germany) 在裂解缓冲液 (Sigma) 中匀浆, 所述裂解缓冲液含有溶于去离子水的 100mM TRIS-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5% Nonidet P-40、10mg/ml 抑肽酶、10mg/ml 亮抑酶肽、5mg/ml 胃蛋白酶抑制剂、1mM 苯甲磺酰氟。以 13,000x g 离心 15 分钟后, 用市售的比色蛋白质测定试剂 (“BCA Protein Assay”, Pierce/Perbio Science, Bonn, Germany) 测定上清中的蛋白质含量。在

上样缓冲液中使 60 μ g 的总蛋白样品变性并且在还原条件下,在 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,同时使用宽范围的预染 SDS-PAGE 蛋白质标准(Bio-Rad, Munich, Germany)。然后通过电转移印迹(Bio-Rad)将蛋白质转移到 Protran BA83 硝酸纤维素膜上(Schleicher&Schuell, Dassel, Germany)。将所述印迹物封闭过夜,然后用 1:500 稀释的单克隆抗小鼠 Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany)、1:200 稀释的多克隆兔抗小鼠 Fas (A-20 克隆, Santa Cruz) 或 1:8,000 稀释的多克隆鸡抗小鼠抗因子 B (由 Dr. Scott R. Barnum 惠赠, University of Alabama at Birmingham, AL, USA) 作为一抗进行孵育,用 1:10,000 稀释的单克隆抗 β -肌动蛋白抗体(AC-15 克隆, Sigma)作为确定电泳条带等量上样的内部对照。在用 1:5,000 稀释的过氧化物酶标记的二抗(Dako, Hamburg, Germany, and Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany)孵育后,使用市售的 **ECL**[®] 蛋白质印迹试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)通过非放射性化学发光技术进行抗体结合显影。通过丽春红染色剂(Sigma)来确认蛋白质等量转移到了印迹膜上。

[0165] 免疫组织化学。为评估神经元的形态、完整性和凋亡,将取出的小鼠脑在液氮中速冻,在 OCT 化合物(Sakura Finetek, Torrance, CA)中包埋并储存于 -80°C 下直至用于分析。在 -20°C 下用恒冷切片机进行 6-8 微米厚的冠状位组织切片。为了进行免疫组织化学分析,用丙酮固定切片,然后用 DAB-四盐酸盐作为色原(Vector, Burlingame, CA)通过标准的生物素/亲和素/过氧化物酶技术进行分析,如之前的文献所述 [13, 32]。下述一抗被用作细胞标记:滴定稀释度为 1:2,000 的单克隆抗 NeuN (Chemicon, Hampshire, UK),用于神经元;1:100 稀释的多克隆兔抗 GFAP (Shandon Immunon, Pittsburgh, PA, USA),用于星形胶质细胞;1:100 稀释的单克隆大鼠抗 CD11b (Accurate Chemical, Westbury, NY, USA),用于小胶质细胞;1:200 稀释的多克隆山羊抗 CD144 (Santa Cruz),用于内皮细胞。使用与所省略的特异性抗体等稀释度的未免疫 IgG (载体)作为阴性对照。

[0166] 为确定脑内神经元细胞死亡的程度,如在先的文献所述 [38],按照制造商的说明书使用“荧光素原位细胞死亡检测试剂盒”(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)进行 TUNEL 组织化学分析。简言之,将切片干燥 30 分钟,然后在室温下用 10% 福尔马林溶液固定。用 PBS 洗涤(三次,每次洗涤 3 分钟)后,在 -20°C 下用冰冷的乙醇-乙酸(2:1)溶液孵育切片 5 分钟。之后用 PBS 洗涤,在室温下用含有溶于 PBS 的 3% Triton X-100 的透化溶液孵育 60min,然后在 37°C 下用溶于含荧光素-dUTP 的反应缓冲液的 TdT 酶孵育 90 分钟。阴性对照仅使用不含 TdT 酶的反应缓冲液进行分析。阳性对照是通过在室温下用 DNA 酶 I 级溶液(500U/ml; Roche)消化等量的脑切片 20 分钟来进行分析,之后要一直远离其它的样品。标记后,用 PBS 再次洗涤所述切片,为了将未染色(TUNEL 阴性)细胞显影,将所述切片用于 DAPI (载体)荧光的 **Vectashield**[®] 封固剂覆盖。在染色后立即用 Axioskop40 荧光显微镜(Zeiss, Germany) (对于 DAPI 荧光用 460nm,而对于 TUNEL 荧光用 520nm)评估所有样品,并且用 Alpha digi doc1201 软件(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)进行分析。

[0167] 统计分析使用市售的软件(SPSS9.0 for **Windows**[®])进行统计分析。通过非配对的 Student' t 检验来确定 fb^{-/-} 和 fb^{+/+} 小鼠血清中补体 C5a 水平的差异。P 值 < 0.05 被认为具有统计学显著性。

[0168] 结果

[0169] 补体激活在脑损伤的 fB^{-/-} 小鼠体内被减弱。

[0170] 对本研究中所用的所有 fB^{-/-} 小鼠和野生型同窝出生小鼠 (fB^{+/+}) 的血清进行的筛选表明, 仅在 fB^{+/+} 动物的血清中可检测到因子 B, 而 fB^{-/-} 小鼠中没有因子 B。进行这些对照实验以确定所述敲除小鼠的血清中完全不含因子 B (数据未出示)。

[0171] 参照图 10, 通过小鼠 C5a 特异的 ELISA 分析来 C57BL/6 品系的脑损伤 fB^{+/+} 和 fB^{-/-} 小鼠 (每组和每个时间点均有 n=6) 和正常 C57BL/6 小鼠 (对照; n=4) 的血清样品 (数据在图 10 中被示出为平均水平 \pm SD; *P<0.05, fB^{+/+} 小鼠与对照小鼠比较且 fB^{+/+} 小鼠与 fB^{-/-} 小鼠比较。TBI, 外伤性脑损伤)。野生型 C57BL/6 小鼠的实验性闭合头部损伤会导致补体级联的全身激活, 这可以通过 4 小时 -7 天所评估的全部时间点的补体激活产物 C5a 的显著升高的血清水平来确定 (与正常小鼠血清相比 p<0.05, 非配对的 Student' t 检验; 图 10)。相比之下, 头部创伤后在所有对应的时间点, fB^{-/-} 小鼠体内过敏毒素 C5a 的血清水平都明显降低, 下降到正常小鼠的基线水平 (与脑损伤 fB^{+/+} 小鼠相比 p<0.05, 非配对的 Student' t 检验; 图 10)。这些数据意味着旁路途径是脑损伤后补体激活的发起者, 这一观点之前仅被 CNS 外部的疾病例如类风湿性关节炎、自身免疫性肾炎和缺血 / 再灌注损伤 [33, 37] 所证实。

[0172] 头部损伤后因子 B 的缺乏会导致神经元细胞死亡减少

[0173] 如之前的文献所述, 在闭合头部损伤后的野生型 C57BL/6 小鼠的受损脑内观察到神经元细胞死亡, 最长可以持续 7 天 [38]。参照图 12-14, 通过使用神经元标记物 NeuN (每张图中的 A、B、F、G) 的特异性抗体的免疫组织化学或通过相邻切片的 TUNEL 组织化学 (每张图中的 D、E、I、J) 来分析野生型 (fB^{+/+}, 每张图中的图 A-E) 和因子 B 敲除小鼠 (fB^{-/-}, 每张图中的图 F-J) 左 (损伤) 半球的冠状位冷冻切片。利用 DAPI 核染显示 TUNEL 切片的整个细胞形态 (每张图中的 C、H)。每张图中的图 B、E、G、J 分别代表每张图中图 A、D、F、I 的 4 倍放大图 (原始放大倍率: 100x (A、C、D、F、H、I), 400x (B、E、G、J))。创伤后 4-24 小时内 fB^{+/+} 小鼠的损伤半球中检测到 TUNEL 阳性细胞的增加 (分别见图 12 和 13), 最长可持续 7 天 (图 14)。4', 6' - 二氨基 -2- 苯基吲哚 (DAPI; 图 12-14 的图 C 和图 H) 的细胞核染色示出了由 TUNEL 组织化学评估的相邻切片中的细胞形态。通过使用特异性细胞标记物 NeuN 对相邻切片的免疫组织化学染色 (图 12-14 的图 A、B、F 和 G) 将神经元确定为主要的 TUNEL 阳性细胞类型。相比之下, 对星形胶质细胞 (抗 GFAP)、小胶质细胞 (抗 CD11b) 和内皮细胞 (抗 CD144) 的染色显示在本发明的头部损伤模型中这些脑中固有细胞没有呈现出相关的 TUNEL 染色 (数据未出示)。此外, 根据神经元典型的细胞大小和形态 (与损伤皮质中 TUNEL 阳性细胞的典型神经元层以及神经胶质细胞相反) 将其确认为主要的 TUNEL 阳性细胞类型。这些研究结果确证了之前公开的当前和其它实验性 TBI 模型中以及头部损伤患者体内的神经元凋亡数据 [38-42]。与脑损伤 fB^{+/+} 小鼠体内神经元细胞死亡程度相比, 创伤后 4 小时 -7 天, fB^{-/-} 小鼠的损伤脑中 TUNEL 阳性神经元明显减少 (图 12-14 的图 D、E、I 和 J)。这些研究结果支持了最近确立的神经元凋亡的补体依赖性调节的观点 [7、10、15、43], 并且提升了补体激活的旁路 (因子 B 依赖性) 途径在调节 TBI 后继发性神经变性方面的体内重要性。

[0174] 就本发明发明人所知, 本研究首次专门研究了旁路途径对脑损伤后神经病理的作用。先前已经证明在多发性硬化动物模型中 fB^{-/-} 小鼠不会有实验性脱髓鞘作用 [44]。

Nataf 及其同事的研究支持了本发明的发明人的研究结果,即在自身免疫和创伤性 CNS 损伤模型中,因子 B 的遗传缺陷导致功能性补体旁路激活的完全丧失,这对于神经保护具有重要作用。

[0175] 在损伤的 fB^{-/-} 脑中 Bcl-2 上调和 Fas 下调

[0176] 已经证明 Fas 介导的外源途径和凋亡内源途径的线粒体抗凋亡介质 Bcl-2 的抑制会促进创伤后的神经元凋亡 [45-51]。参照图 11,将匀浆好的假手术和头部损伤的 fB^{+/+} 和 fB^{-/-} 小鼠的损伤半球脑组织样品在 SDS-PAGE 上电泳,转移到硝酸纤维素膜上,用 Bcl-2 的特异性单克隆抗体分析并且用化学发光测定法 (ECL[®] system, Amersham) 检测。与头部损伤的野生型同窝出生小鼠相比,在 24 小时处的敲除小鼠体内,所显影的对应于小鼠 Bcl-2 的 26kD 的条带得到了增强。此外,与 fB^{+/+} 小鼠相比,在所评估的所有时间点的脑损伤敲除小鼠体内,都有明显的 Fas 受体染色强度的下调(数据未出示)。示例的印迹是代表了三个单独实验。

[0177] 更具体地说,通过蛋白质印迹分析,本发明的发明人发现,与 fB^{+/+} 同窝出生小鼠相比,创伤后 24 小时的头部损伤 fB^{-/-} 小鼠脑匀浆物中,起保护作用的 Bcl-2 蛋白质的水平明显上调(图 11)。在 TBI 后的其他时间点,未见到敲除小鼠和野生型小鼠的 Bcl-2 表达有明显差异(图 11)。对于凋亡的外源途径,与 fB^{+/+} 动物相比,在 TBI 后 4 小时至 7 天的 fB^{-/-} 小鼠体内可见到 Fas 受体表达的明显下调(图 11)。尽管这些数据不是量化的,但是在上述时间点时,脑损伤的敲除小鼠体内的 26kDa 条带(Bcl-2;图 11)和 48kDa 条带(Fas;数据未出示)染色强度的差异似乎比对应的野生型同窝出生小鼠体内的差异更强烈。这些研究结果表明补体激活的旁路途径通过在损伤脑中抑制 Bcl-2 并诱导 Fas 表达来参与 TBI 后的神经元凋亡调节。如之前其他研究者在不同的模型系统中所确定那样 [45-47],这两方面在损伤后神经元凋亡的调节中都很关键。对受控的皮层撞击脑损伤模型的实验研究证明,与野生型同窝出生小鼠相比,在创伤后的 7 天中,过表达 Bcl-2 基因的转基因小鼠的皮质损伤体积明显减小 [52]。因此,Bcl-2 在 TBI 后的凋亡的线粒体(内源)途径的调节中起重要作用 [4, 50, 52, 53]。

[0178] 本发明的发明人之前已经证明,通过 Crry-Ig(一种鼠重组嵌合融合分子)在 C3 转化酶水平药理性地“全”抑制补体激活,会导致增强脑内 Bcl-2 基因和蛋白质的表达并增加脑损伤小鼠海马内的神经元存活率 [32]。在鼠自身免疫脑炎模型中,通过 Crry-Ig 阻断补体激活会导致神经元凋亡的显著下降 [15]。

[0179] 本研究的数据支持了补体激活的旁路途径对 TBI 神经病理后遗症的生物学重要性,并且为未来的选择性旁路途径抑制剂(例如因子 B 拮抗剂)的药理学研究提供了基础 [33, 54]。

[0180] 总之,本发明的数据首次提供了补体激活的旁路途径对创伤后补体激活(生成 C5a)的总体程度和对脑损伤后继发的神经元细胞死亡(TUNEL、Bcl-2 和 Fas 数据)的重要作用的证据。这是一项新的和具有挑战性的发现,因为所有之前公开的对 TBI 模型中实验性补体抑制的研究都着眼于在 C3 转化酶的“共同接点”水平 [26, 28-32] 或级联的更下游水平干扰补体级联,例如通过过敏毒素 C5a 或其受体的特异性阻断 [30]。补体旁路在脑损伤神经病理中的病理生理作用一直受到低估,这可能部分是由于很久以前就确立了经典途径在各种神经疾病中的突出作用 [55, 56]。但是,本研究的结果表明这些见解未必反映了补

体旁路在复杂的多因子神经炎性疾病中“真正的”体内重要性,例如在 TBI 的情况下 [57]。在严重头部损伤患者的鞘内区室中因子 B 水平升高 [36] 这一事实进一步支持了本发明的权利要求,即因子 B 的药理靶向是合理的和可预测的。

[0181] 实施例 4 的参考文献

- [0182] 1. McArthur et al., Brain Pathol 2004, 14:185-94.
- [0183] 2. Gaetz, Clin Neurophysiol 2004, 115:4-18.
- [0184] 3. Eldadah et al., J Neurotrauma 2000, 17:811-829.
- [0185] 4. Raghupathi R, Brain Pathol 2004, 14:215-222.
- [0186] 5. Wong et al., Neurocrit Care 2005, 3:177-182.
- [0187] 6. Zhang et al., Crit Care 2005, 9:66-75.
- [0188] 7. Stahel et al., Brain Res Rev 1998, 27:243-56.
- [0189] 8. Cole et al., Clin Sci (Lond) 2003, 104:455-66.
- [0190] 9. Schmidt et al., Eur J Trauma 2004, 30:135-149.
- [0191] 10. Cole et al., Mol Immunol 2006, Jan 5 [Epub ahead of print].
- [0192] 11. Farkas et al., J Physiol 1998, 507:679-87.
- [0193] 12. Nataf et al., Trends Neurosci 1999, 22:397-402.
- [0194] 13. Stahel et al., J Neuroimmunol 2000, 109:164-72.
- [0195] 14. O' Barr et al., J Immunol 2001, 166:4154-4162.
- [0196] 15. Alexander et al., J Immunol 2005, 175:8312-8319.
- [0197] 16. Morgan, Crit Rev Immunol 1999, 19:173-98.
- [0198] 17. Singhrao et al., Am J Pathol 2000, 157:905-18.
- [0199] 18. Bellander et al., J Neurotrauma 2001, 18:1295-311.
- [0200] 19. Ohlsson et al., J Neurotrauma 2003, 20:895-904.
- [0201] 20. Ohlsson and Havton, Neurosci Lett 2005, Nov 10 [Epub ahead of print].
- [0202] 21. Casarsa et al., Eur J Immunol 2003, 33:1260-1270.
- [0203] 22. Xiong et al., J Neurosci 2003, 23:955-60.
- [0204] 23. Bellander et al., J Neurosurg 1996, 85:468-75.
- [0205] 24. Keeling et al., J Neuroimmunol 2000, 105:20-30.
- [0206] 25. Kyrkanides et al., J Neuroimmunol 2001, 119:268-277.
- [0207] 26. Rancan et al., J Cereb Blood Flow Metab 2003, 23:1070-4.
- [0208] 27. Stahel et al., J Neurotrauma 2001, 18:773-81.
- [0209] 28. Kaczorowski et al., J Cereb Blood Flow Metab 1995, 15:860-4.
- [0210] 29. Hicks et al., J Neurotrauma 2002, 19:705-14.
- [0211] 30. Sewell et al., J Neuroimmunol 2004, 155:55-63.
- [0212] 31. Pillay et al., Ann N Y Acad Sci 2005, 1056:450-461.
- [0213] 32. Leinase et al., Exp Neurol 2006 (in press).
- [0214] 33. Holers and Thurman, Mol Immunol 2004, 41:147-152.
- [0215] 34. Thurman et al., J Immunol 2003, 170:1517-1523.
- [0216] 35. Thurman et al., Kidney Int 2005, 67:524-30.

- [0217] 36. Kossmann et al., J Neuroimmunol1997, 73:63-9.
- [0218] 37. Thurman and Holers, J Immunol2006, 176:1305-1310.
- [0219] 38. Stahel et al., J Cereb Blood Flow Metab2000, 20:369-80.
- [0220] 39. Rink et al., Am J Pathol1995, 147:1575-1583.
- [0221] 40. Yakovlev et al., J Neurosci1997, 17:7415-7424.
- [0222] 41. Williams et al., Acta Neuropathol2001, 102:581-590.
- [0223] 42. Marciano et al., J Neurosci2004, 24:2866-2876.
- [0224] 43. Elward et al., J Biol Chem2005, 280:36342-54.
- [0225] 44. Nataf et al., J Immunol2000, 165:5867-5873.
- [0226] 45. Felderhoff-Mueser et al., Neurobiol Dis2002, 11:231-245.
- [0227] 46. Qiu et al., J Neurosci2002, 22:3504-3511.
- [0228] 47. Raghupathi et al., Neuroscience2002, 110:605-616.
- [0229] 48. Raghupathi et al., J Neurotrauma2003, 20:421-435.
- [0230] 49. Strauss et al., Neurotox Res2004, 6:333-342.
- [0231] 50. Mohamad et al., Biocell2005, 29:149-161.
- [0232] 51. Friedlander, N Engl J Med2003, 348:1365-1375.
- [0233] 52. Raghupathi et al., J Cereb Blood Flow Metab1998, 18:1259-69.
- [0234] 53. Shacka et al., Curr Drug Targets CNS Neurol Disord2005, 4:25-39.
- [0235] 54. Thurman et al., Mol Immunol2005, 42:87-97.
- [0236] 55. Morgan and Gasque, Immunol Today1996, 17:461-6.
- [0237] 56. Barnum, Mol Med1999, 5:569-82.
- [0238] 57. Schmidt et al., Brain Res Rev2005, 48:388-399.
- [0239] 58. Matsumoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA1997, 94:8720-8725.
- [0240] 59. Holers, Immunopharmacology2000, 49:125-31.
- [0241] 60. Roof and Hall, J Neurotrauma2000, 17:367-388.
- [0242] 61. Yao et al., J Neurotrauma2005, 22:656-658.
- [0243] 62. Chen et al., J Neurotrauma1996, 13:557-68.
- [0244] 63. Yatsiv et al., J Cereb Blood Flow Metab2002, 22:971-8.
- [0245] 64. Yatsiv et al., FASEB J2005, 19:1701-1703.
- [0246] 本申请中所引用的每篇参考文献的全文以引用的方式纳入。
- [0247] 由于本发明的各种实施方案已经得到了详细的描述,所以对所述实施方案的修改和变动对本领域技术人员来说将是显而易见的。但是,应当清楚理解的是这些修改和改编,如下述权利要求所阐明地在本发明的范围之内。

[0001]

序列表

<110> 科罗拉多大学评议会
 南卡罗来纳州医科大学研究发展基金会

<120> 用于治疗外伤性脑损伤、脊髓损伤及相关病症的补体旁路抑制

<130> 5375-3-PCT

<150> 60/685, 289
 <151> 2005-05-26

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> I

Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg
 20 25 30

Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser
 35 40 45

Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser
 50 55 60

Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly
 65 70 75 80

Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala
 85 90 95

Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly
 100 105 110

Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser
 115 120 125

Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr
 130 135 140

Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn
 145 150 155 160

[0002]

Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys
 165 170 175

Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser
 180 185 190

Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly
 195 200 205

Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr
 210 215 220

Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu
 225 230 235 240

Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln
 245 250 255

Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr
 260 265 270

Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly
 275 280 285

Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly
 290 295 300

Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile
 305 310 315 320

Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr
 325 330 335

Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly
 340 345 350

Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp
 355 360 365

Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile
 370 375 380

Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr
 385 390 395 400

Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys

[0003]

405	410	415
Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro 420	425	430
Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn 435	440	445
Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val 450	455	460
Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met 465	470	475
Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln 485	490	495
Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met 500	505	510
Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe 515	520	525
Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu 530	535	540
Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn 545	550	555
Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp 565	570	575
Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile 580	585	590
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg 595	600	605
Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro 610	615	620
Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu 625	630	635
Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys 645	650	655

[0004]

Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile
660 665 670

Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro
675 680 685

Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile
690 695 700

Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly
705 710 715 720

Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala
725 730 735

His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu
740 745 750

Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
755 760

<210> 2
<211> 739
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr
35 40 45

Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
50 55 60

Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
65 70 75 80

Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
85 90 95

Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
100 105 110

[0005]

Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
 115 120 125

Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
 130 135 140

Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
 145 150 155 160

Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
 165 170 175

Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser
 180 185 190

Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala
 195 200 205

Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp
 210 215 220

Gly His Gly Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro
 225 230 235 240

Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile
 245 250 255

Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile
 260 265 270

Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr
 275 280 285

Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser
 290 295 300

Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu
 305 310 315 320

Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala
 325 330 335

Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp
 340 345 350

[0006]

Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn
 355 360 365

Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu
 370 375 380

Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val
 385 390 395 400

Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala
 405 410 415

Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp
 420 425 430

Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp
 450 455 460

Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser
 465 470 475 480

Lys Gly His Glu Ser Cys Met Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val
 485 490 495

Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile
 500 505 510

Lys Val Ser Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val
 515 520 525

Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile
 530 535 540

Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys
 545 550 555 560

Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu
 565 570 575

Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln
 580 585 590

Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val
 595 600 605

[0007]

Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn
610 615 620

Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly
625 630 635 640

Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu
645 650 655

Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly
660 665 670

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln
675 680 685

Val Gly Val Ile Ser Trp Gly Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys
690 695 700

Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu
705 710 715 720

Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu
725 730 735

Gly Phe Leu

<210> 3
<211> 70
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

Ala Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys
20 25 30

Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser
35 40 45

Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg
50 55 60

Lys Ala Glu Cys Arg Ala

[0008]

Leu Gln Gly Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Leu Cys Pro Ser Gly Phe Tyr
 50 55 60

Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser
 65 70 75 80

Asp Leu Gln Thr Arg Asp Gln Lys Ile Val Gln Lys Ala Glu Cys Arg
 85 90 95

Ala Ile Arg Cys Pro Arg Pro Gln Asp Phe Glu Asn Gly Glu Phe Trp
 100 105 110

Pro Arg Ser Pro Phe Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Ile Ser Phe Gln Cys
 115 120 125

Tyr Asp Gly Tyr Val Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Glu
 130 135 140

Asn Gly Arg Trp Asp Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asp Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Tyr Cys Pro Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser
 165 170 175

Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ile Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu
 180 185 190

Val Leu Arg Gly Ser Gln Lys Arg Lys Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp
 195 200 205

Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Ser Pro
 210 215 220

Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu
 225 230 235 240

Gly Ala Asp Ala Glu Asp Gly His Ser Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg
 245 250 255

Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu
 260 265 270

Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ser Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Arg
 275 280 285

[0010]

Cys Leu Thr Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Arg Pro
 290 295 300

Arg Tyr Gly Leu Leu Thr Tyr Ala Thr Val Pro Lys Val Leu Val Arg
 305 310 315 320

Val Ser Asp Glu Arg Ser Ser Asp Ala Asp Trp Val Thr Glu Lys Leu
 325 330 335

Asn Gln Ile Ser Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr
 340 345 350

Lys Arg Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Ala Gly Asp
 355 360 365

Ala Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Ile Met
 370 375 380

Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asn Pro Val Thr Val Ile Gln
 385 390 395 400

Asp Ile Arg Ala Leu Leu Asp Ile Gly Arg Asp Pro Lys Asn Pro Arg
 405 410 415

Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asp
 420 425 430

Ser Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu His His
 435 440 445

Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Gln
 450 455 460

Met Ile Asp Glu Thr Lys Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu
 465 470 475 480

His Lys Lys Gly Asn Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile
 485 490 495

Ser Val Thr Arg Pro Leu Lys Gly His Glu Thr Cys Met Gly Ala Val
 500 505 510

Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Met Val Asp
 515 520 525

Asp Gln Lys His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Gln Arg Arg Asp
 530 535 540

[0011]

Leu Glu Ile Glu Glu Val Leu Phe His Pro Lys Tyr Asn Ile Asn Gly
545 550 555 560

Lys Lys Ala Glu Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu
565 570 575

Val Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Leu Arg Pro Ile
580 585 590

Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Gln
595 600 605

Thr Ala Thr Cys Lys Gln His Lys Glu Gln Leu Leu Pro Val Lys Asp
610 615 620

Val Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Gln Gly Lys Ser Leu Thr Arg Lys
625 630 635 640

Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Ala Ser Cys Glu Arg Asp
645 650 655

Ala Thr Lys Ala Gln Gly Tyr Glu Lys Val Lys Asp Ala Ser Glu Val
660 665 670

Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Asp Pro Tyr Ala Asp
675 680 685

Pro Asn Thr Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Val His Lys
690 695 700

Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly Val Val Asp
705 710 715 720

Val Cys Arg Asp Gln Arg Arg Gln Gln Leu Val Pro Ser Tyr Ala Arg
725 730 735

Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Asp Lys
740 745 750

Leu Lys Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
755 760

<210> 7
<211> 253
<212> PRT
<213> 人 (homo sapiens)

[0012]

<400> 7

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

Ala Cys Ala Ala Pro Pro Arg Gly Arg Ile Leu Gly Gly Arg Glu Ala
 20 25 30

Glu Ala His Ala Arg Pro Tyr Met Ala Ser Val Gln Leu Asn Gly Ala
 35 40 45

His Leu Cys Gly Gly Val Leu Val Ala Glu Gln Trp Val Leu Ser Ala
 50 55 60

Ala His Cys Leu Glu Asp Ala Ala Asp Gly Lys Val Gln Val Leu Leu
 65 70 75 80

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

Val Leu Arg Ala Val Pro His Pro Asp Ser Gln Pro Asp Thr Ile Asp
 100 105 110

His Asp Leu Leu Leu Gln Leu Ser Glu Lys Ala Thr Leu Gly Pro
 115 120 125

Ala Val Arg Pro Leu Pro Trp Gln Arg Val Asp Arg Asp Val Ala Pro
 130 135 140

Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp Gly Ile Val Asn His Ala Gly
 145 150 155 160

Arg Arg Pro Asp Ser Leu Gln His Val Leu Leu Pro Val Leu Asp Arg
 165 170 175

Ala Thr Cys Asn Arg Arg Thr His His Asp Gly Ala Ile Thr Glu Arg
 180 185 190

Leu Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser
 195 200 205

Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly Val Leu Glu Gly Val Val Thr Ser
 210 215 220

Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Arg Lys Lys Pro Gly Ile Tyr Thr Arg
 225 230 235 240

[0013]

Val Ala Ser Tyr Ala Ala Trp Ile Asp Ser Val Leu Ala
245 250

<210> 8
<211> 469
<212> PRT
<213> 人 (homo sapiens)

<400> 8

Met Ile Thr Glu Gly Ala Gln Ala Pro Arg Leu Leu Leu Pro Pro Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser Asp Pro Val Leu Cys
20 25 30

Phe Thr Gln Tyr Glu Glu Ser Ser Gly Lys Cys Lys Gly Leu Leu Gly
35 40 45

Gly Gly Val Ser Val Glu Asp Cys Cys Leu Asn Thr Ala Phe Ala Tyr
50 55 60

Gln Lys Arg Ser Gly Gly Leu Cys Gln Pro Cys Arg Ser Pro Arg Trp
65 70 75 80

Ser Leu Trp Ser Thr Trp Ala Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Glu Gly
85 90 95

Ser Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly Gln Cys Ser
100 105 110

Gly Lys Val Ala Pro Gly Thr Leu Glu Trp Gln Leu Gln Ala Cys Glu
115 120 125

Asp Gln Gln Cys Cys Pro Glu Met Gly Gly Trp Ser Gly Trp Gly Pro
130 135 140

Trp Glu Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Lys Gly Thr Arg Thr Arg Arg
145 150 155 160

Arg Ala Cys Asn His Pro Ala Pro Lys Cys Gly Gly His Cys Pro Gly
165 170 175

Gln Ala Gln Glu Ser Glu Ala Cys Asp Thr Gln Gln Val Cys Pro Thr
180 185 190

His Gly Ala Trp Ala Thr Trp Gly Pro Trp Thr Pro Cys Ser Ala Ser
195 200 205

[0014]

Cys His Gly Gly Pro His Glu Pro Lys Glu Thr Arg Ser Arg Lys Cys
 210 215 220

Ser Ala Pro Glu Pro Ser Gln Lys Pro Pro Gly Lys Pro Cys Pro Gly
 225 230 235 240

Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Arg Cys Thr Gly Leu Pro Pro Cys Pro Val
 245 250 255

Ala Gly Gly Trp Gly Pro Trp Gly Pro Val Ser Pro Cys Pro Val Thr
 260 265 270

Cys Gly Leu Gly Gln Thr Met Glu Gln Arg Thr Cys Asn His Pro Val
 275 280 285

Pro Gln His Gly Gly Pro Phe Cys Ala Gly Asp Ala Thr Arg Thr His
 290 295 300

Ile Cys Asn Thr Ala Val Pro Cys Pro Val Asp Gly Glu Trp Asp Ser
 305 310 315 320

Trp Gly Glu Trp Ser Pro Cys Ile Arg Arg Asn Met Lys Ser Ile Ser
 325 330 335

Cys Gln Glu Ile Pro Gly Gln Gln Ser Arg Gly Arg Thr Cys Arg Gly
 340 345 350

Arg Lys Phe Asp Gly His Arg Cys Ala Gly Gln Gln Gln Asp Ile Arg
 355 360 365

His Cys Tyr Ser Ile Gln His Cys Pro Leu Lys Gly Ser Trp Ser Glu
 370 375 380

Trp Ser Thr Trp Gly Leu Cys Met Pro Pro Cys Gly Pro Asn Pro Thr
 385 390 395 400

Arg Ala Arg Gln Arg Leu Cys Thr Pro Leu Leu Pro Lys Tyr Pro Pro
 405 410 415

Thr Val Ser Met Val Glu Gly Gln Gly Glu Lys Asn Val Thr Phe Trp
 420 425 430

Gly Arg Pro Leu Pro Arg Cys Glu Glu Leu Gln Gly Gln Lys Leu Val
 435 440 445

[0015]

Val Glu Glu Lys Arg Pro Cys Leu His Val Pro Ala Cys Lys Asp Pro
450 455 460

Glu Glu Glu Glu Leu
465

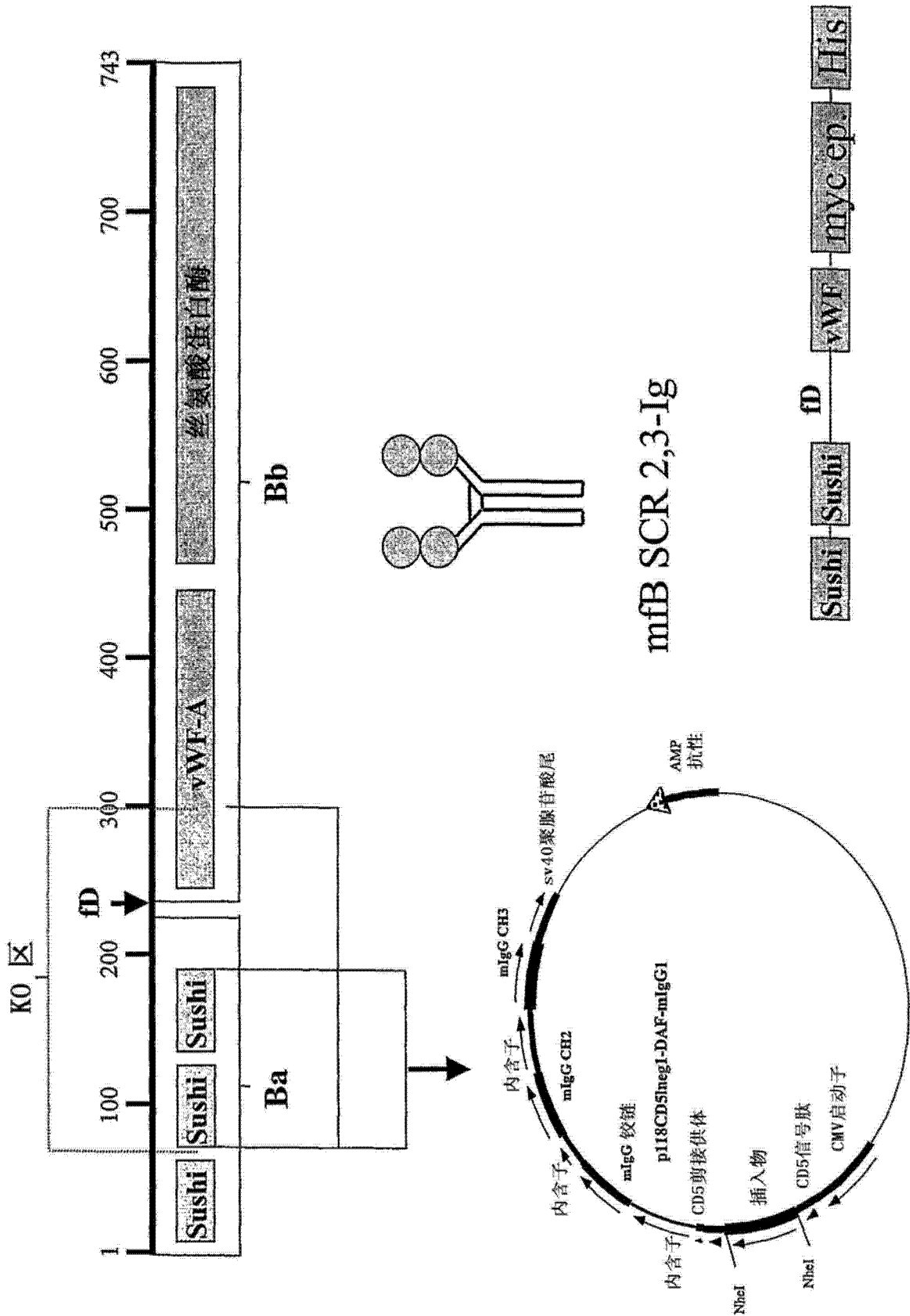


图 1

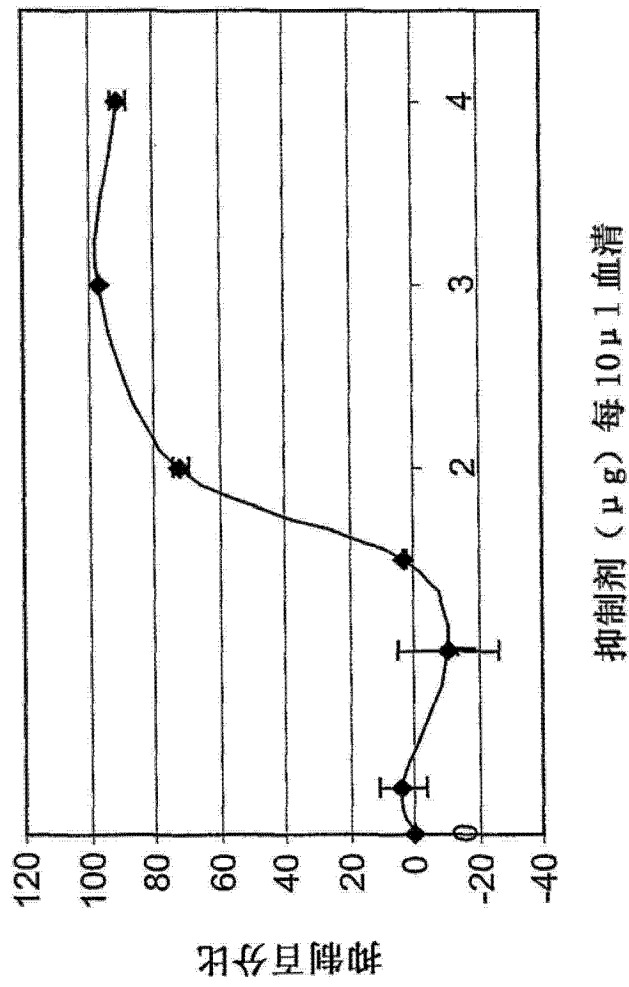


图 2A

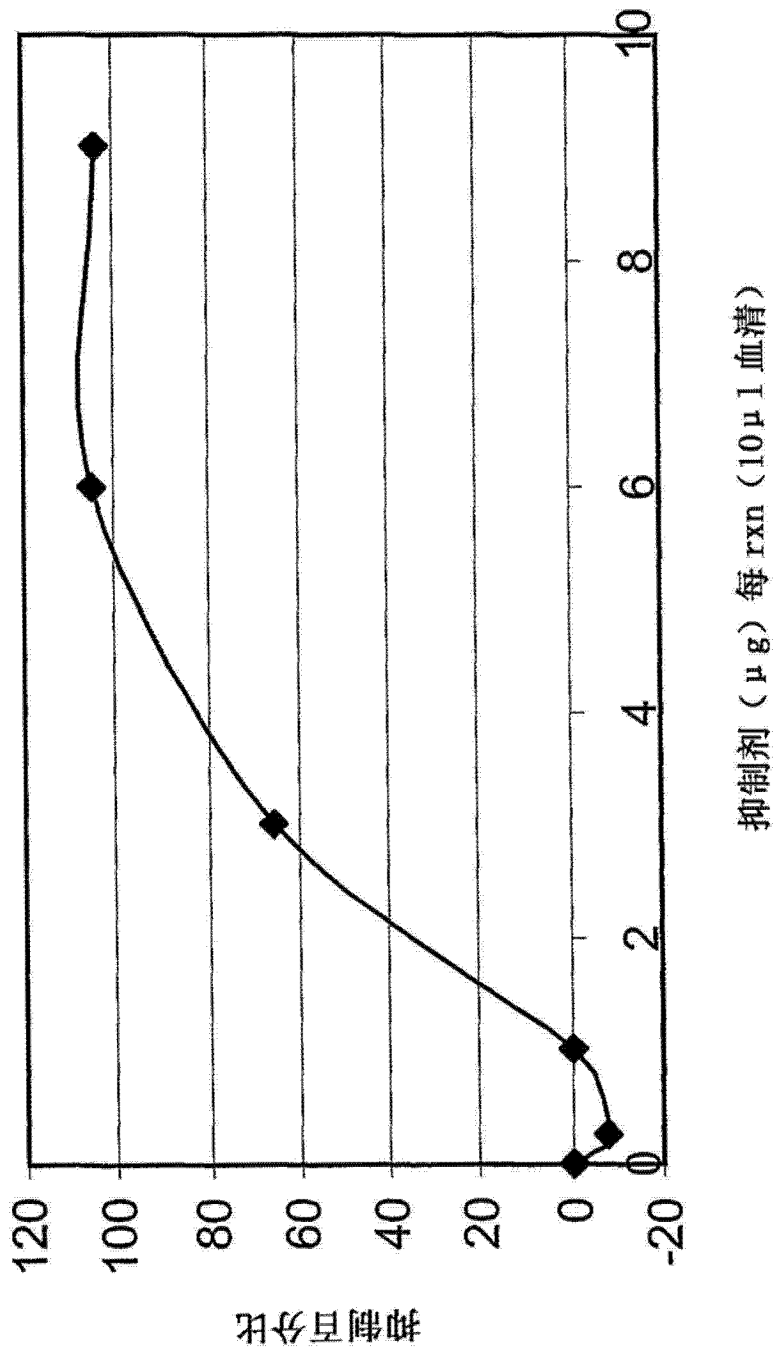


图 2B

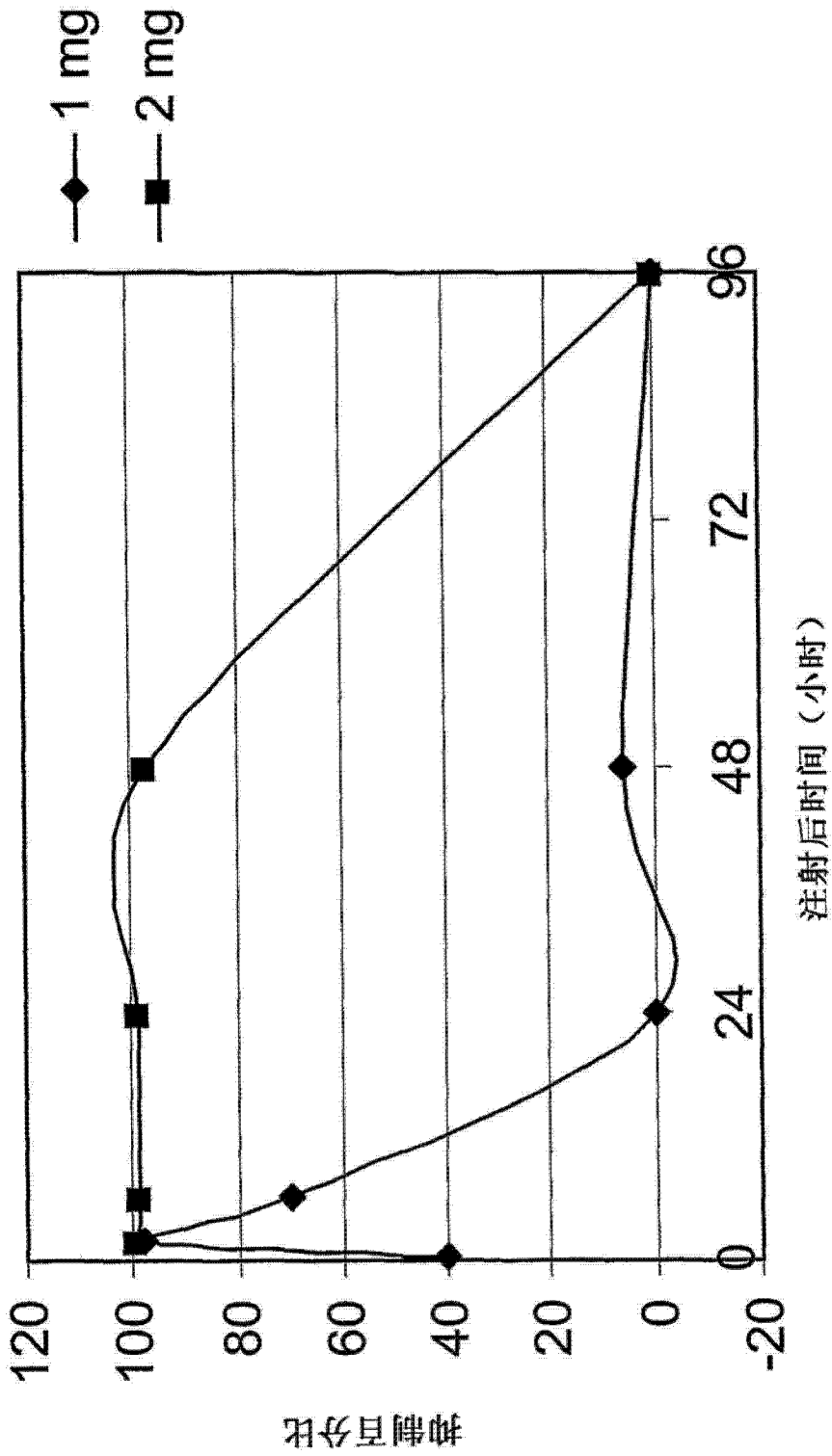


图 3

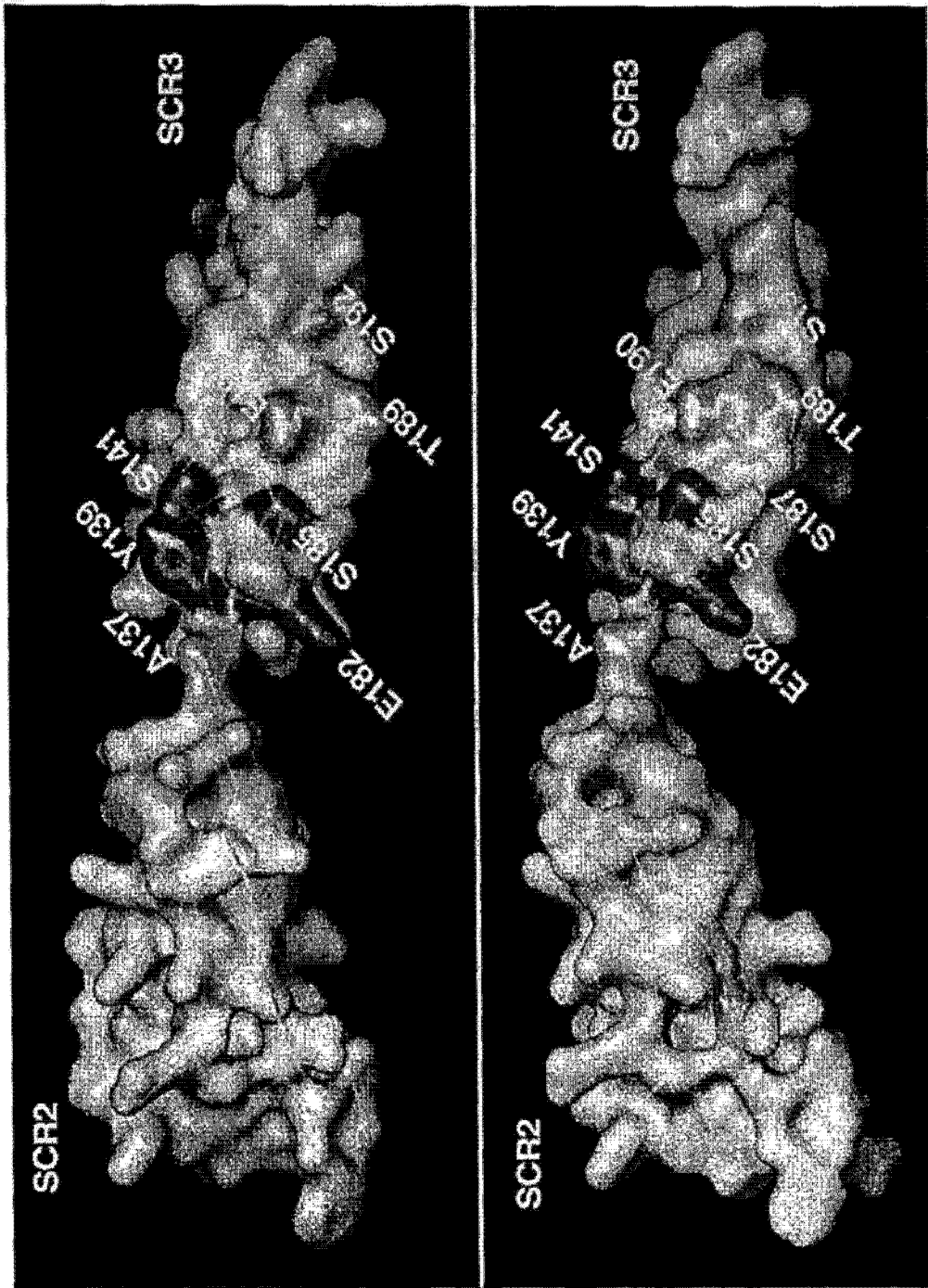


图 4

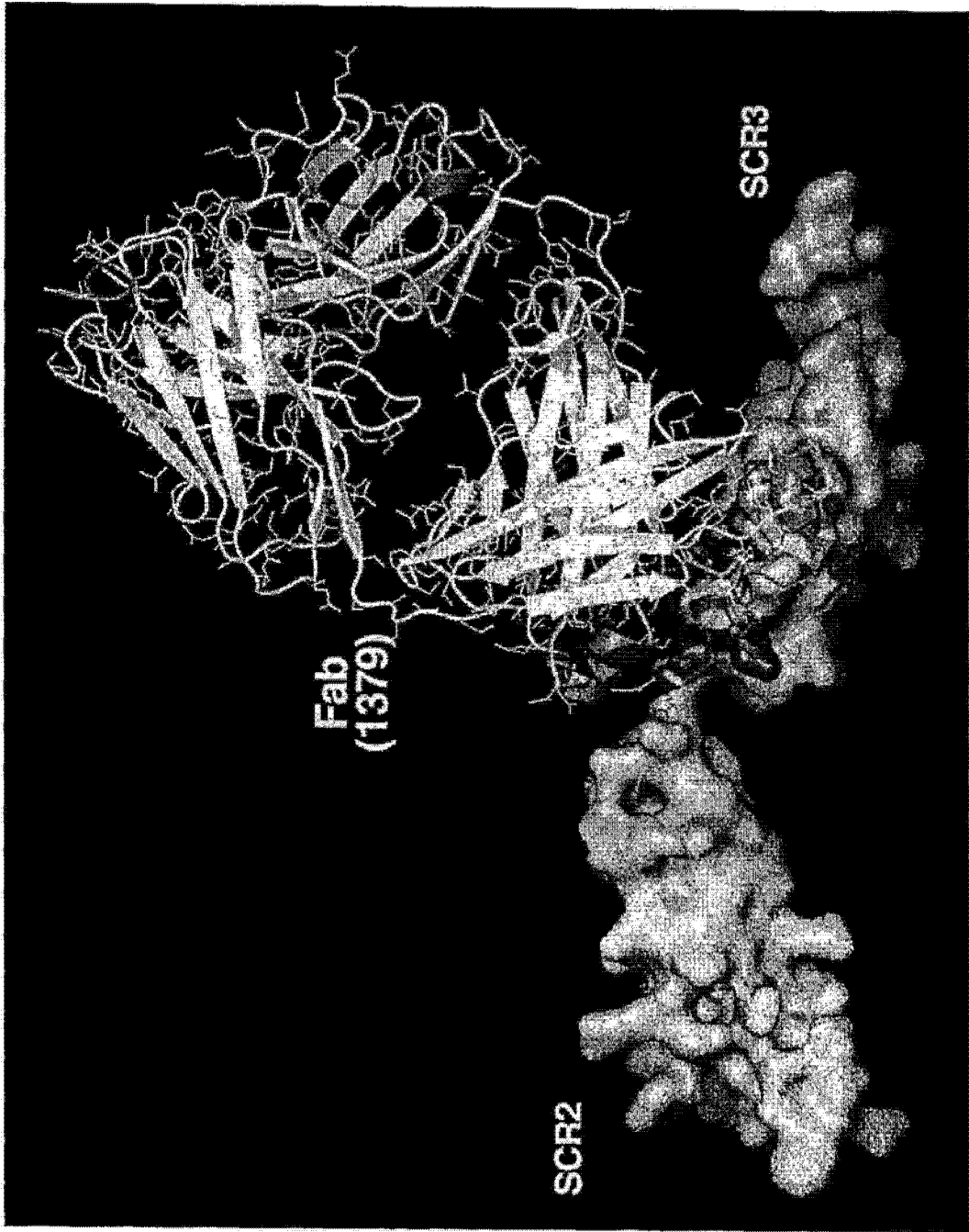


图 5

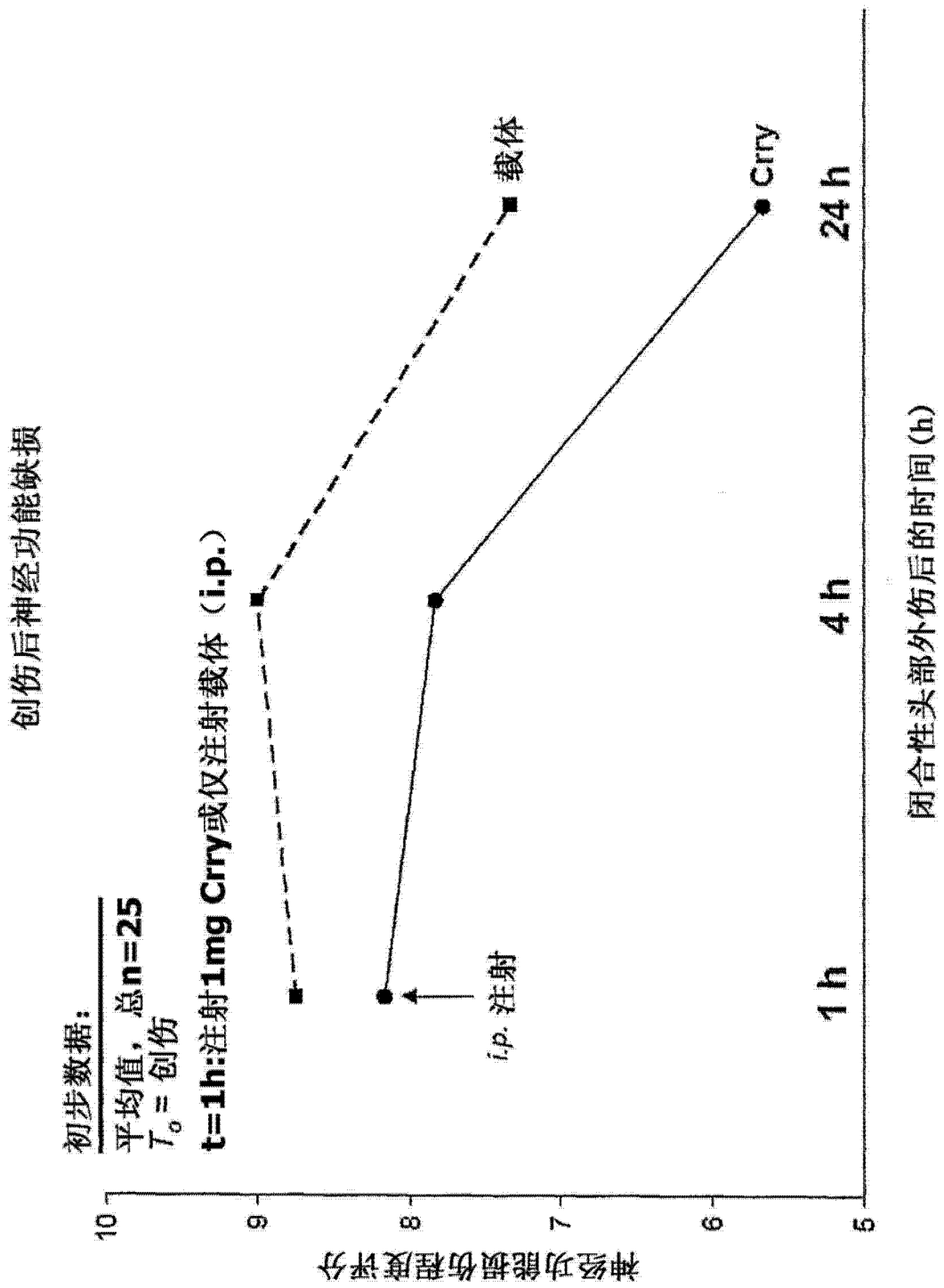


图 6

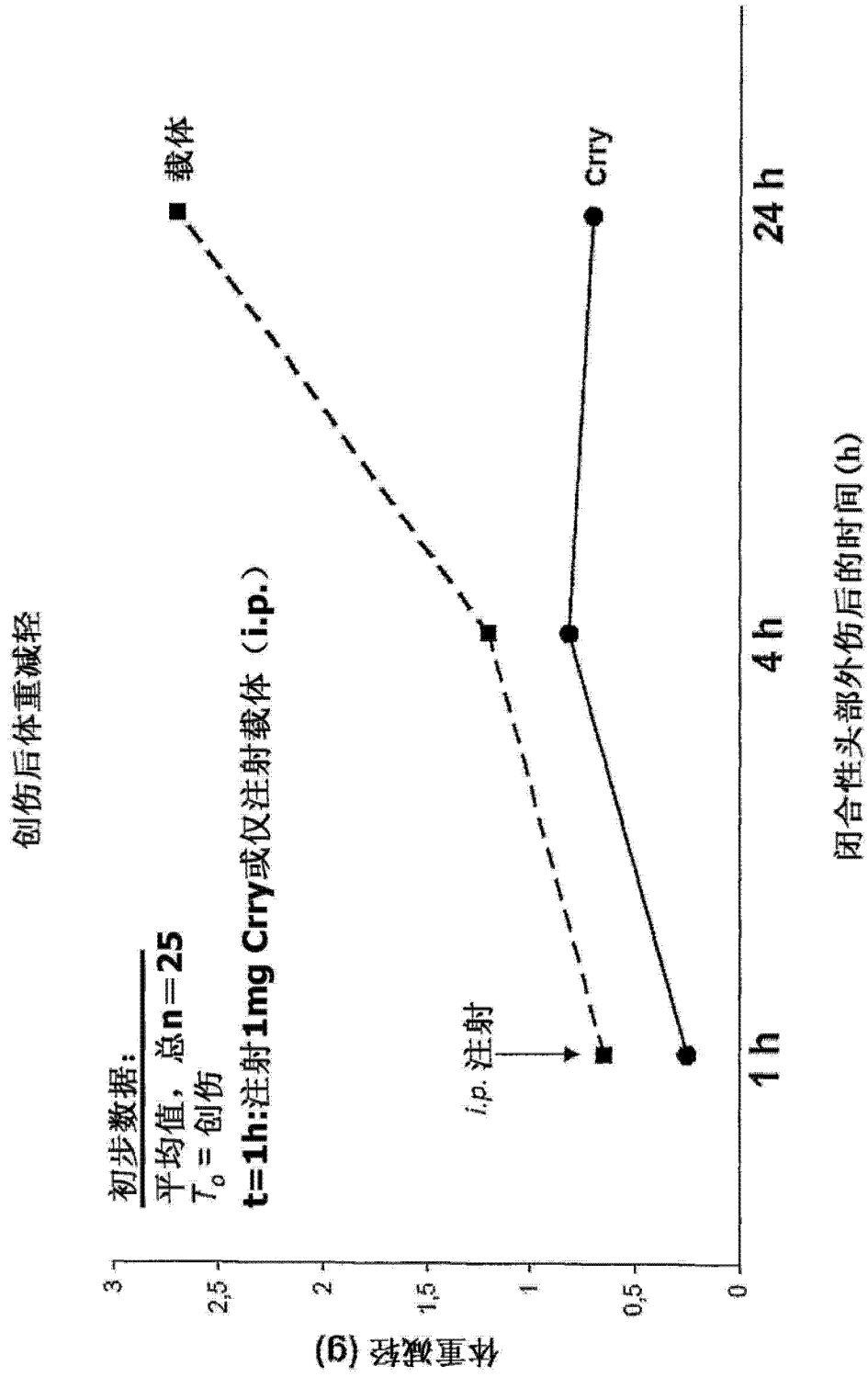


图 7

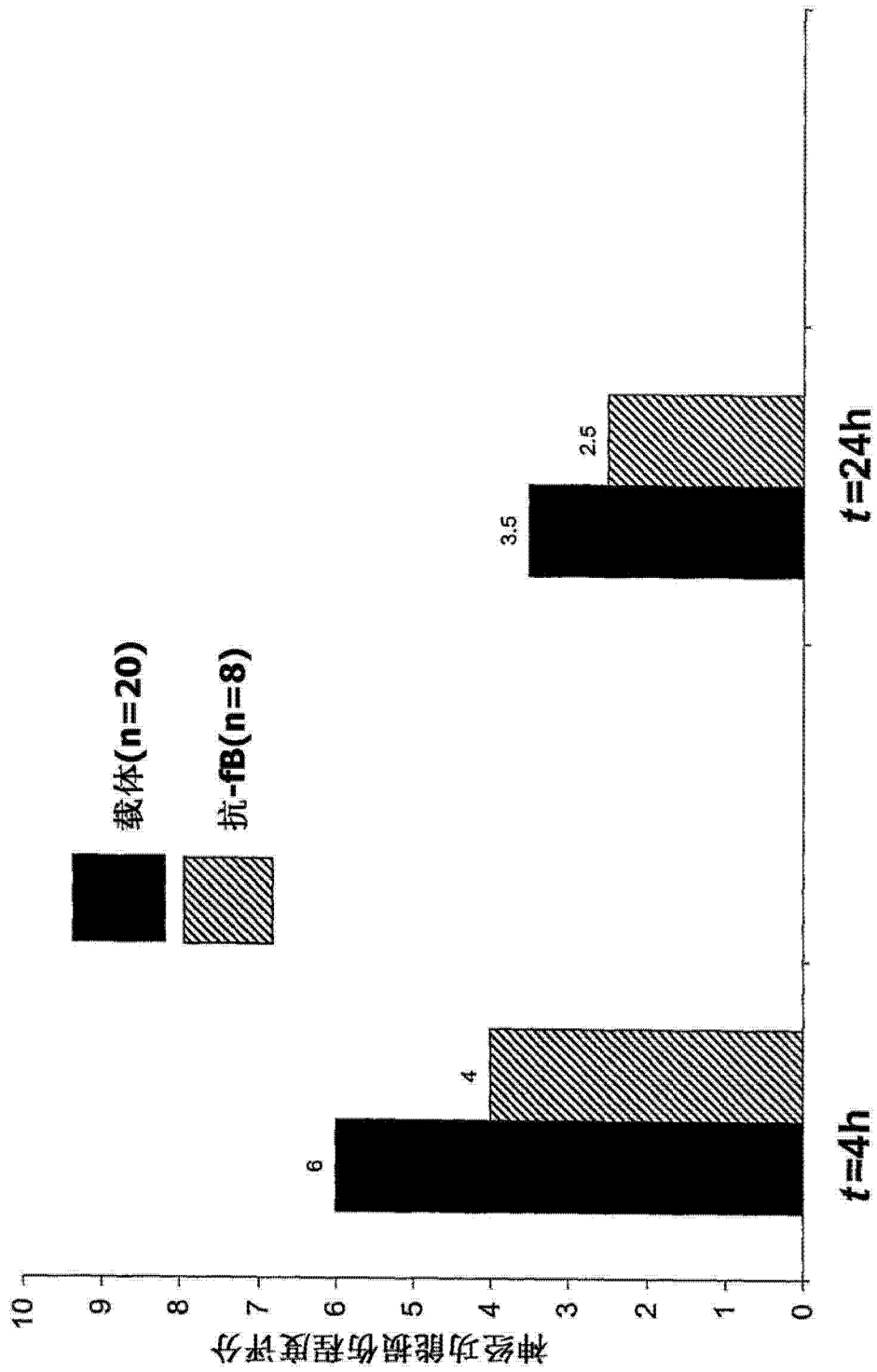


图 8

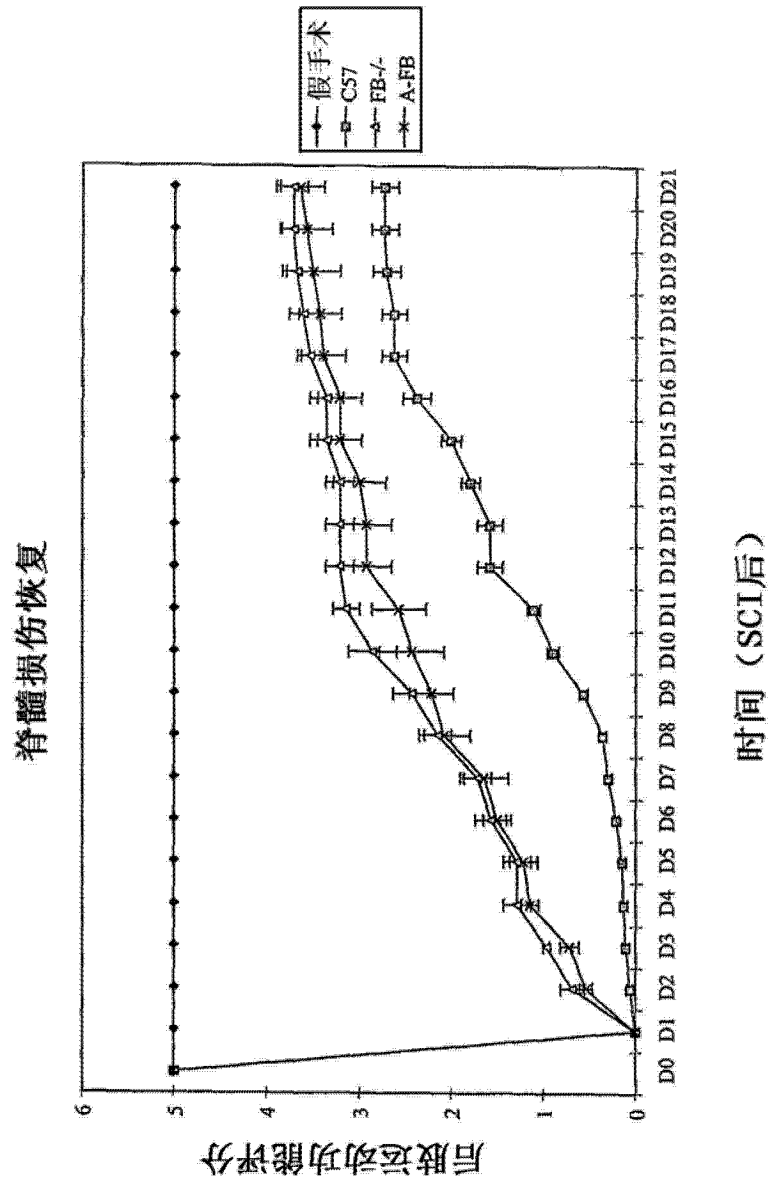


图 9

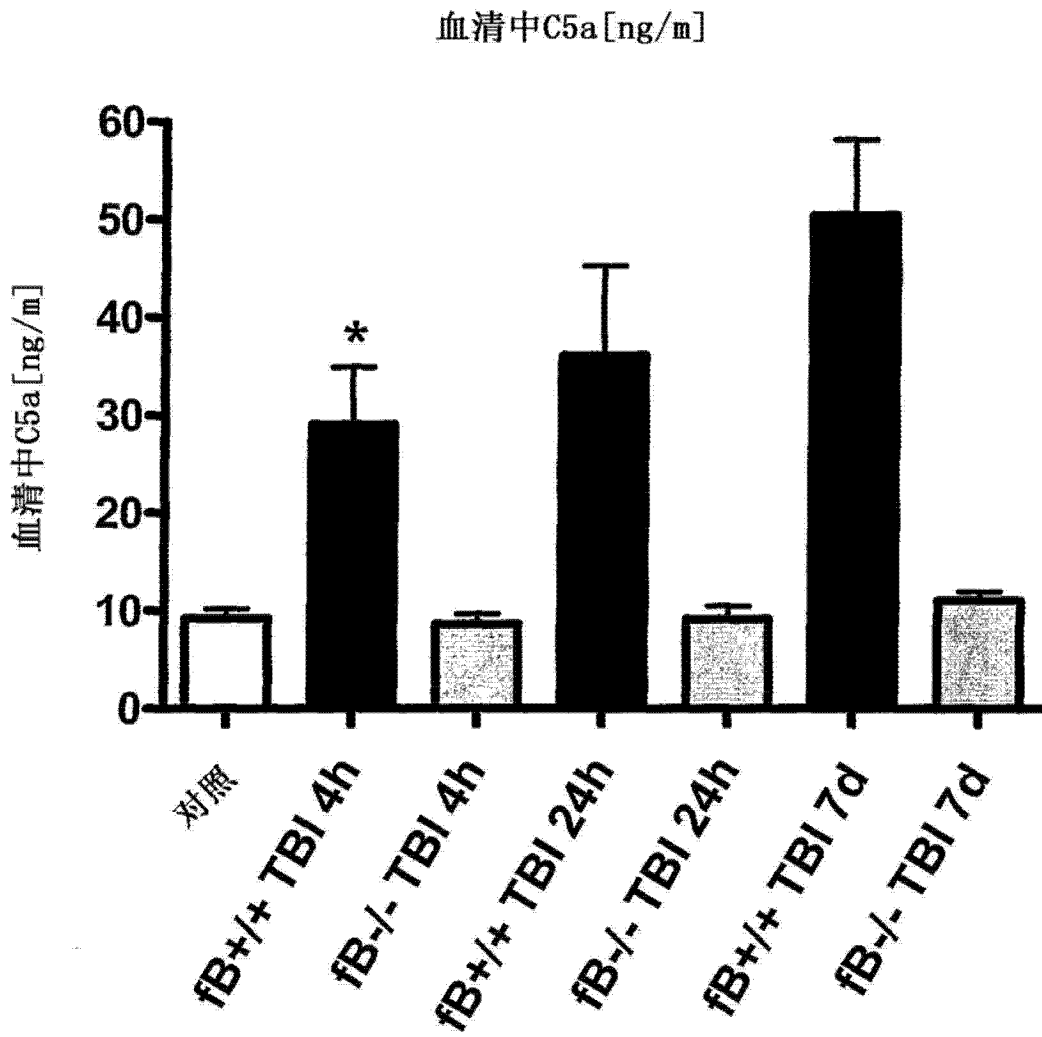


图 10

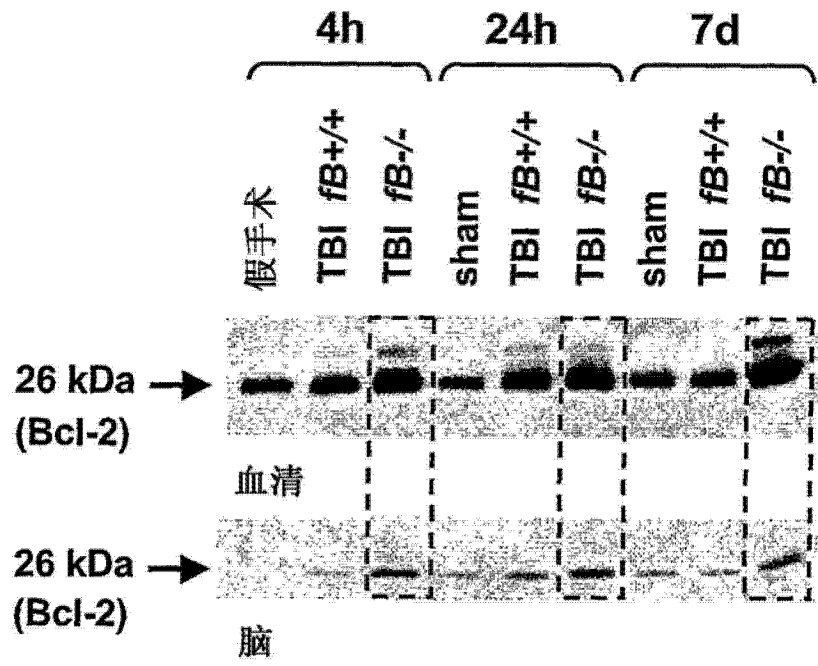


图 11

闭合性头部外伤, t=4h

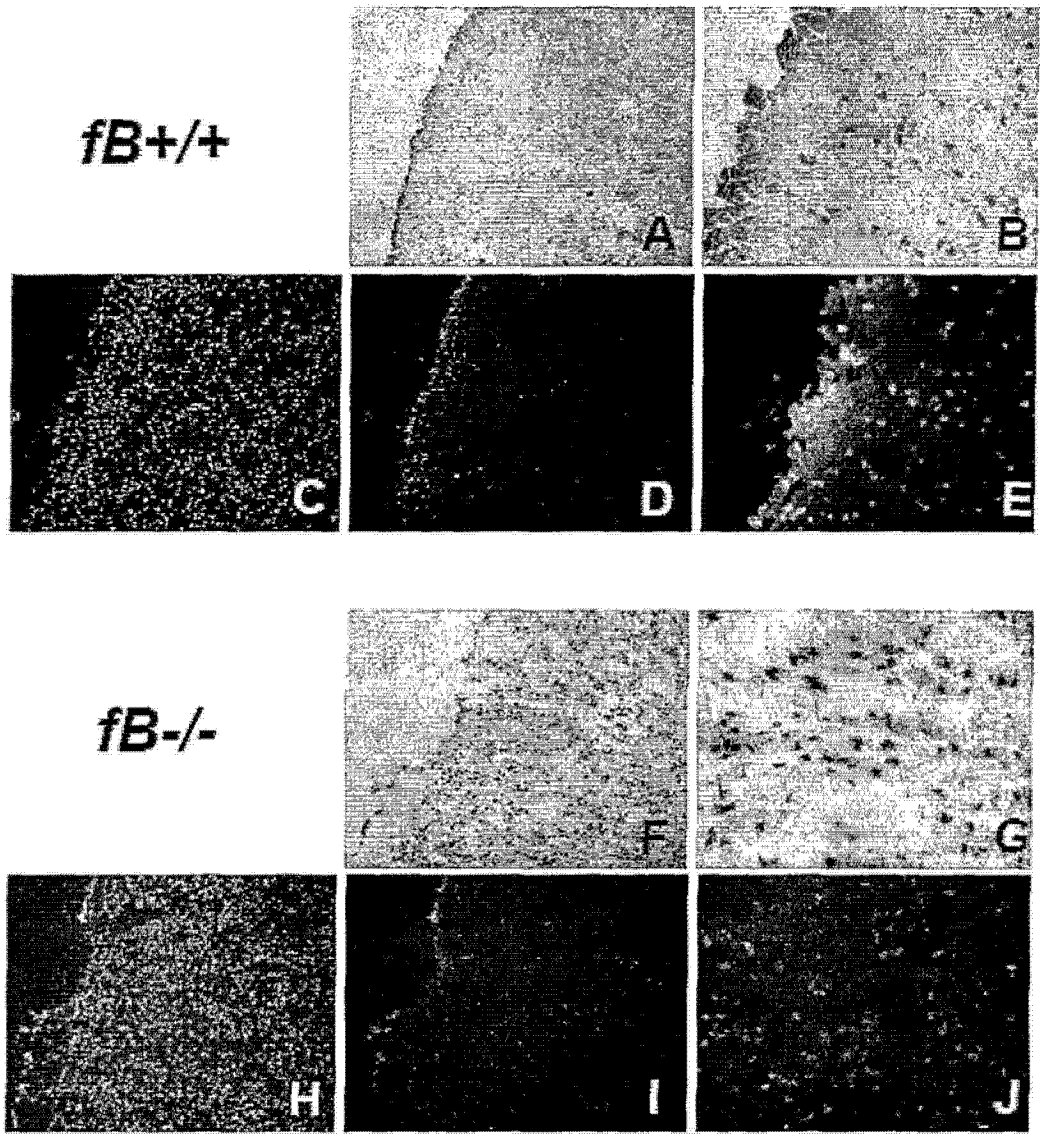


图 12

闭合性头部外伤, t=24h

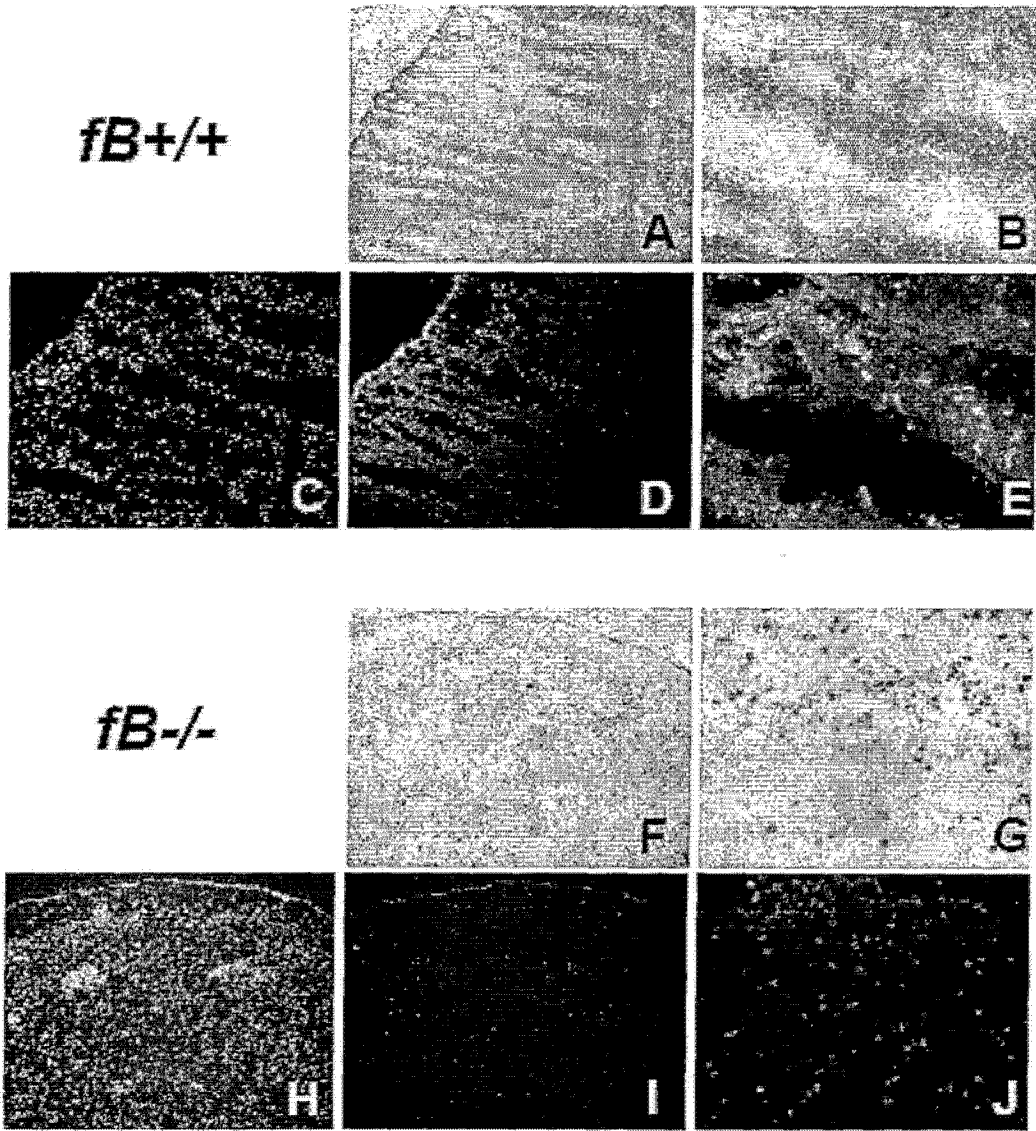


图 13

闭合性头部外伤, t=7d

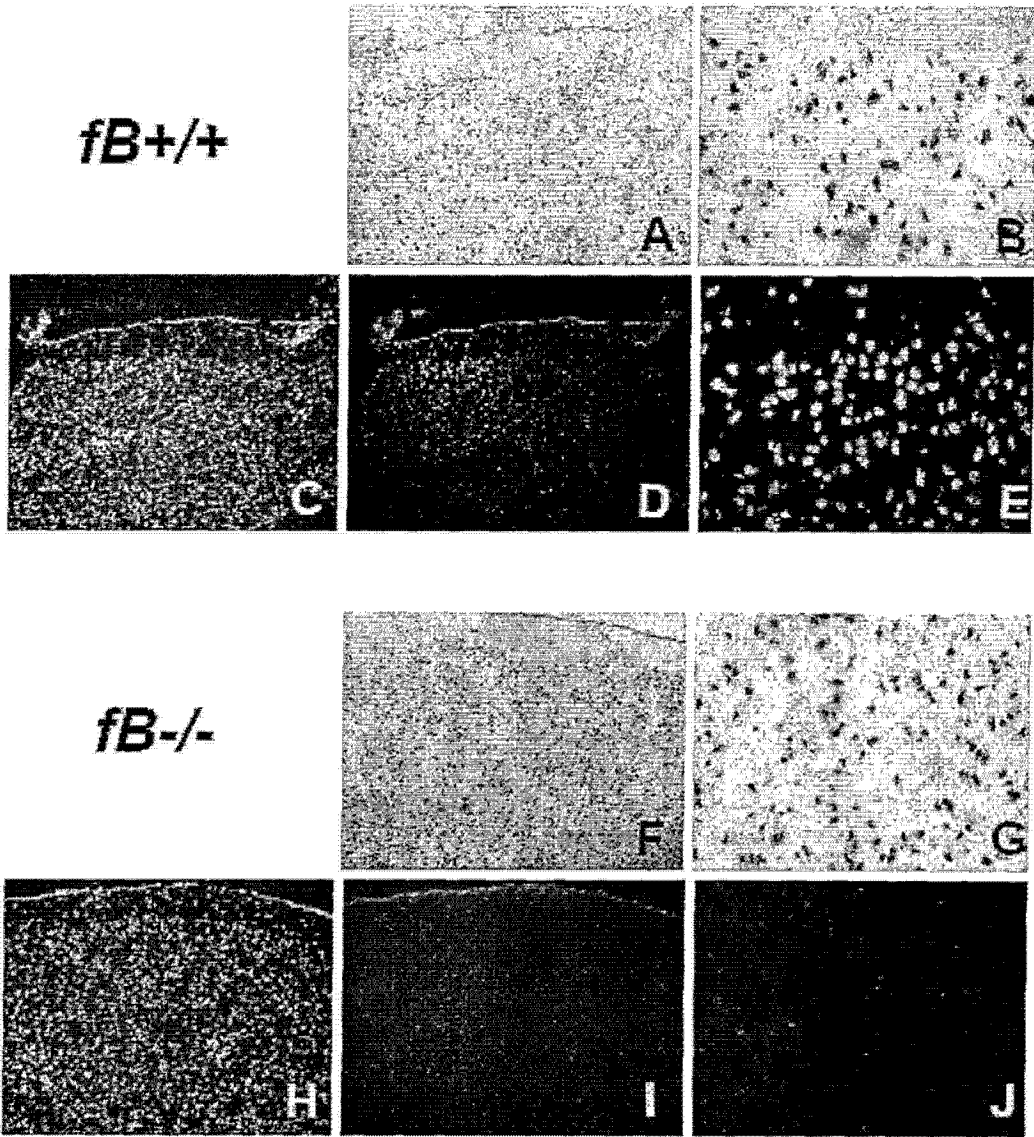


图 14