



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102625712 B

(45)授权公告日 2017.07.25

(21)申请号 201080040105.X

(22)申请日 2010.07.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102625712 A

(43)申请公布日 2012.08.01

(30)优先权数据

61/225,887 2009.07.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.03.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/042015 2010.07.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/008885 EN 2011.01.20

(73)专利权人 博尔托拉制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 U.辛哈 卢根民 A.哈特查理拉哈

S.J.霍伦巴克

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 38/48(2006.01)

C12N 9/64(2006.01)

A61P 7/00(2006.01)

A61P 7/04(2006.01)

(56)对比文件

WO 2007096116 A1,2007.08.30,

WO 2009042962 A2,2009.04.02,

LU GENMIN ET AL.Recombinant antidote
for reversal of Anticoagulation by Factor
Xa Inhibitors.《SOCIETY-OF-HEMATOLOGY》
.2008,第112卷(第11期),全文.

审查员 王超

权利要求书2页 说明书72页

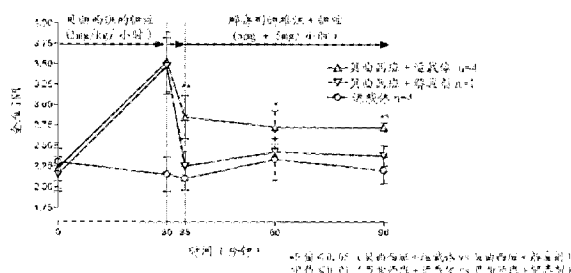
序列表34页 附图28页

(54)发明名称

用于因子XA抑制剂的解毒剂的单位剂量制
剂及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及针对靶向因子Xa的抗凝血剂的
解毒剂的单位剂量制剂。本发明揭示的是在正经
历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的患者中停
止或阻止出血的方法。



1. 一种单位剂量制剂, 包含药学上可接受的载体和400mg至900mg的由SEQ ID NO.13的氨基酸序列组成的双链多肽。

2. 权利要求1所述的单位剂量制剂, 其具有400mg的所述多肽。

3. 权利要求1所述的单位剂量制剂, 其具有800mg的所述多肽。

4. 权利要求1所述的单位剂量制剂, 其具有900mg的所述多肽。

5. 权利要求1-4中任一项所述的单位剂量制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中选择性结合和抑制外源施用的因子Xa抑制剂。

6. 权利要求1-4中任一项所述的单位剂量制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中防止、减少或停止出血。

7. 权利要求1-4中任一项所述的单位剂量制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中校正fXa抑制剂依赖性药效或替代标志物。

8. 权利要求5所述的用途, 其中所述单位剂量制剂是通过推注静脉内施用的。

9. 权利要求6所述的用途, 其中所述单位剂量制剂是通过推注静脉内施用的。

10. 权利要求7所述的用途, 其中所述单位剂量制剂是通过推注静脉内施用的。

11. 权利要求5所述的用途, 其中所述单位剂量制剂是作为输注或推注加输注的组合施用的。

12. 权利要求6所述的用途, 其中所述单位剂量制剂是作为输注或推注加输注的组合施用的。

13. 权利要求7所述的用途, 其中所述单位剂量制剂是作为输注或推注加输注的组合施用的。

14. 权利要求11-13中任一项所述的用途, 其中所述制剂的10%-20%作为推注施用, 而将其余制剂输注一段时间直至出血基本上停止。

15. 权利要求11所述的用途, 其中所述制剂施用6小时。

16. 权利要求12所述的用途, 其中所述制剂施用6小时。

17. 权利要求13所述的用途, 其中所述制剂施用6小时。

18. 权利要求14所述的用途, 其中所述制剂施用6小时。

19. 权利要求11所述的用途, 其中所述制剂施用6至12小时。

20. 权利要求12所述的用途, 其中所述制剂施用6至12小时。

21. 权利要求13所述的用途, 其中所述制剂施用6至12小时。

22. 权利要求14所述的用途, 其中所述制剂施用6至12小时。

23. 权利要求11所述的用途, 其中所述制剂施用12至24小时。

24. 权利要求12所述的用途, 其中所述制剂施用12至24小时。

25. 权利要求13所述的用途, 其中所述制剂施用12至24小时。

26. 权利要求14所述的用途, 其中所述制剂施用12至24小时。

27. 权利要求11所述的用途, 其中所述制剂施用多至48小时。

28. 权利要求12所述的用途, 其中所述制剂施用多至48小时。

29. 权利要求13所述的用途, 其中所述制剂施用多至48小时。

30. 权利要求14所述的用途,其中所述制剂施用多至48小时。

用于因子Xa抑制剂的解毒剂的单位剂量制剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请案根据35U.S.C. §119(e) 主张2009年7月15日提出申请的美国临时申请案第61/225,887号的权利,此处将其以整体引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及逆转和/或中和因子Xa抑制剂的解毒剂的单位剂量制剂。特别地,解毒剂可以是因子Xa (fXa) 衍生物,所述因子Xa (fXa) 衍生物具有降低的固有促凝血活性或没有固有促凝血活性,但也能够结合和/或中和fXa抑制剂,由此作为靶向fXa的抗凝血剂的解毒剂。本发明还涉及使用特定剂量解毒剂的方法。

背景技术

[0004] 市场上在治疗或预防在不活动时或正接受医疗手术时易于形成血凝块的患者(例如,那些患有凝血病症的患者)的不期望血栓形成时需要抗凝血剂。然而,抗凝血疗法的一个重要限制是与治疗有关的出血风险,且在服用过量或如果需要紧急手术的情况下限制了迅速逆转抗凝血活性的能力。因此,极为期望针对所有形式的抗凝血疗法的特定且有效解毒剂。出于安全考虑,同样有利的是在研发新的抗凝血剂药物中获得抗凝血剂-解毒剂对。

[0005] 目前对于过度抗凝血可用的抗凝血剂-解毒剂对是肝素-鱼精蛋白和华法林(warfarin)-维生素K。新鲜的冷冻血浆和重组因子VIIa (rfVIIa) 也已用作遭受严重创伤或严重出血的患者在低分子量肝素治疗中的非特异性解毒剂。(Lauritzen, B. 等人, Blood, 2005, 607A-608A) 还报导了鱼精蛋白片段(美国专利第6,624,141号) 和小的合成肽(美国专利第6,200,955号) 作为肝素或低分子量肝素解毒剂;和凝血酶突变蛋白质(美国专利第6,060,300号) 作为凝血酶抑制剂的解毒剂。已报导将凝血酶原中间产物和衍生物作为水蛭素和合成凝血酶抑制剂的解毒剂(美国专利第5,817,309号和第6,086,871号)。

[0006] 抗凝血疗法的一种有希望的形式靶向因子Xa (fXa), 且实际上,目前在临床研发的不同阶段中有多种直接fXa抑制剂用于抗凝血疗法中。一种直接fXa抑制剂Xarelto™ (利伐沙班(rivaroxaban)) 已经被批准在欧盟和加拿大用于临床使用以预防矫形外科手术患者中的静脉血栓。这些中的多数是小分子。尽管这些新的fXa抑制剂展示有希望用于治疗,但仍需要特定且有效的解毒剂。在过度抗凝血或利用这些fXa抑制剂治疗的患者需要手术的情况下,可能需要一种试剂来实质上中和所施用的一种或多种fXa抑制剂并恢复正常止血。

[0007] 目前可用试剂(例如重组因子VIIa (rfVIIa)) 是以机械方式进行限制且并非特定用于fXa抑制剂的逆转,且因此临床医生极为期望有改良的选择。在人类研究中,已经使用rfVIIa来逆转间接抗凝血酶III依赖性fXa抑制剂(例如磺达肝素(fondaparinux) 和依达肝素(idraparinux)) 的作用(Bijsterveld, NR等人, Circulation, 2002, 106:2550-2554; Bijsterveld, NR等人, British J. of Haematology) 2004 (124) : -658)。因子VIIa (fVIIa) 的作用机制是与组织因子一起作用以将血液循环中存在的因子X (fX) 转化成fXa来恢复患者的正常止血。这种作用模式必然意味着为了中和活性位点定向的fXa抑制剂所可能达到的

fXa的最高可能浓度受fX的循环血浆浓度限制。因此,使用rfVIIa来逆转直接fXa抑制剂的作用的潜在在机械上受限。由于fX的循环血浆浓度为150纳摩尔(“nM”),所以通过这种模式所产生的fXa的最大量将为150nM。小分子fXa抑制剂(例如利伐沙班(rivaroxaban))的报告治疗浓度(大约600nM,Kubitza D等人,Eur.J.Clin.Pharmacol,2005,61:873-880)高于由rfVIIa所生成的fXa的可能量。因此,使用rfVIIa来逆转由fXa抑制剂所产生的治疗或超治疗水平的抗凝作用提供的效能水平不充分。如图4中所示,在中和因子Xa抑制剂贝曲西班牙(betrixaban)的抗凝血活性中使用rfVIIa具有有限的作用(如下文所阐述)。重组fVIIa展示50nM至100nM的剂量响应解毒活性,但所述作用在100nM至200nM之间趋于稳定,此表明其解毒作用除其浓度以外还受其他因素限制。在所有所测试的rfVIIa浓度中,贝曲西班牙仍展示fXa的剂量响应抑制,在250nM的浓度下高达约75%抑制。此观察结果与fVIIa的建议作用机制一致。此结果还被展示rfVIIa不能完全逆转磺达肝素对凝血酶生成和凝血酶原活化的参数的抑制作用的研究所支持。(Gerotiafas,GT等人,Thrombosis & Haemostasis 2204(91):531-537)。

[0008] 外源活性fXa不能以类似于rfVIIa的方式直接施用受试者。不像rfVIIa在缺少其辅因子组织因子的情况下具有极低促凝血活性那样,天然fXa是强效酶且具有造成血栓形成的潜在风险。因此,使用rfVIIa或活性fXa作为fXa抗凝血疗法的解毒剂有缺点。

[0009] 本发明的制剂和方法中使用的解毒剂阐述于美国专利申请公开案第2009-0098119号中。这一出版物及本文所提及的任何出版物、专利和专利申请案均以整体引用的方式并入本文中。

[0010] 尽管在前面提到的申请中披露了解毒剂,解毒剂的剂量给药是确保患者安全的一个关键因素。

发明内容

[0011] 现在已发现,以一定剂量提供fXa蛋白质的经修饰衍生物的施用可用作靶向fXa的抗凝血剂的解毒剂。所述fXa蛋白质的经修饰衍生物并不与fXa竞争组装成凝血酶原酶复合物,而是结合和/或实质上中和抗凝血剂,例如fXa抑制剂。可用作解毒剂的衍生物经修饰以降低或去除固有的促凝血和抗凝血活性,同时保留结合至抑制剂的能力。预计本发明的衍生物可包括修饰活性位点、或改变Gla结构域或自fXa去除整个Gla结构域、或其各种组合。由于已知活性位点经修饰的全长fXa是抗凝血剂,因此进一步预计修饰Gla结构域将降低或消除fXa衍生物对正常止血的抗凝血作用。

[0012] 在一个实施例中,本发明涉及一种单位剂量制剂,其包含药学上可接受的载体和包含氨基酸序列SEQ ID NO.13或与SEQ ID NO.13具有至少80%同源性的多肽的双链多肽(two chain polypeptide),其量是约10mg-约2g。在一些实施例中,所述量是约100mg-约1.5g或约200mg-约1g或约400mg-约900mg。

[0013] 在某些实施例中,多肽的量对于中和因子Xa抑制剂是约20%、50%、75%、90%、95%、99%或约100%有效的。

[0014] 在另一实施例中,本发明涉及用于向正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者施用的单位剂量制剂,所述制剂包含药学上可接受的载体和中和量的包含氨基酸序列SEQ ID NO.13或与SEQ ID NO.13具有至少80%同源性的多肽的双链多肽,所述中和量是在

至少约30分钟内,使多肽的循环浓度与因子Xa抑制剂的循环浓度的摩尔比为至少约1:1。在一个实施例中,所述摩尔比涉及贝曲西班诱导的抗凝血。在其他实施例中摩尔比是约1:1或约2:1和在再其他实施例中摩尔比是约4:1或更高。

[0015] 在一些实施例中,载体是盐水。在一些实施例中载体是无菌盐水。在其他实施例中,制剂具有每毫升盐水约0.2-约10mg多肽的浓度。在其他实施例中,浓度是每毫升盐水约2-约6mg多肽或每毫升盐水约2mg多肽。

[0016] 在某些实施例中,多肽是冻干的。

[0017] 在另一实施例中,本发明涉及一种在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中,选择性结合和抑制外源施用的因子Xa抑制剂的方法,包括向所述受试者施用本发明的单位剂量制剂。

[0018] 在再另一实施例中,本发明涉及一种在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中,防止、减少或停止出血的方法,包括向所述受试者施用本发明的单位剂量制剂。

[0019] 在再另一实施例中,本发明涉及一种在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的患者中,校正fXa抑制剂依赖性药效或替代标志物的方法,包括向所述受试者施用本发明的单位剂量制剂。

[0020] 在本发明的方法中,所述制剂可以通过推注静脉注射或推注和输注的组合或通过皮下施用的方式施用。人类凝血因子的皮下剂量给药已经报告于文献中。参见McCarthy K等人,Thrombo.Haemost.,2002,87(5),824-30;Gerrard AJ等人,Br.J. Haematol.,1992,81(4):610-3;Miekkka SI等人,Haemophilia,1998,4(4),436-42。在某些实施例中,约10-约20%的制剂是作为推注施用的,而其余制剂输注一段时间直至出血已基本上停止。预计输注可以施用约6小时、或约6-约12小时、或约12-约24小时或48小时。

[0021] 在另一方面中,经修饰的因子Xa蛋白是与能够延长所述因子Xa衍生物的血浆半寿期(或循环半寿期)的试剂共同施用的。在又一方面中,解毒剂与一个部分偶联(conjugate)以延长其血浆半寿期。

[0022] 在另一方面中,本发明提供试剂盒,其包含用于抗凝血用途的fXa抑制剂和当需要实质上中和所述fXa抑制剂的抗凝血活性时使用的fXa抑制剂解毒剂(或因子Xa衍生物)。当所述解毒剂是以冻干形式提供使,所述试剂盒优选进一步包含一瓶无菌盐水。

[0023] 本发明进一步提供的是一种肽偶联物,其包含以共价或非共价方式连接至刚刚所阐述多肽的载体。所述载体可为脂质体、胶束(micelle)、药学上可接受的聚合物、或药学上可接受的载体。

[0024] 可以在整个说明书的其余部分发现本发明额外的实施例。

[0025] 附图简述

[0026] 图1示意性地展示表13中所示的人类因子X(SEQ ID NO.1)的结构域结构,如在Leytus等人,Biochem.,1986,25,5098-5102中所报告。SEQ ID NO.1是由表14中所示的人类fX的核苷酸序列(SEQ ID NO.2)编码的人类fX的氨基酸序列,如现有技术中所知。例如,经翻译的氨基酸序列报告于Leytus等人,Biochem.,1986,25,5098-5102中且可在<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>的基因库(GenBank)作为“NM_000504”中找到。此序列中的氨基酸编号是基于fX序列。人类fX前体(SEQ ID NO.1)含有prepro-前导序列(SEQ ID NO.1的氨基酸1至40),随后是对应于fX轻链

(LC)的序列(SEQ ID NO.1的氨基酸41至179)、对应于在fX分泌期间去除的RKR(SEQ ID NO.16)三联体的序列(SEQ ID NO.1的氨基酸180至182)、和对应于fX重链的序列(SEQ ID NO.1的氨基酸183至488),所述重链含有激活肽(AP)(SEQ ID NO.1的氨基酸183至234)和催化结构域(SEQ ID NO.1的氨基酸235至488)。

[0027] 图2(SEQ ID NO.3)展示成熟人类因子X的氨基酸序列。此图中氨基酸编号是基于成熟fX序列,自fX轻链的N-末端开始。因子X在血浆中作为通过二硫键连接的双链分子循环。轻链(LC)具有139个氨基酸(SEQ ID NO.1的氨基酸41至179)残基且含有富 γ -羧基谷氨酸(G1a)的结构域(SEQ ID NO.3的氨基酸1-45)(包括短芳香族堆栈(AS)(SEQ ID NO.3的氨基酸40-45)),之后是两个表皮生长因子(EGF)样结构域(EGF1:SEQ ID NO.3的氨基酸46-84,EGF2:SEQ ID NO.3氨基酸85-128)。重链(HC)具有306个氨基酸且含有52个氨基酸的激活肽(AP:SEQ ID NO.3的氨基酸143-194),然后是催化结构域(SEQ ID NO.3的氨基酸195-448)。胰凝乳蛋白酶编号中的H57-D102-S195的催化三元体等效物位于fX序列中的His236、Asp282、和Ser379处并加下划线(SEQ ID NO.3的氨基酸236、282和379)。

[0028] 图3示意性地展示图2中所示的成熟人类因子X的结构域结构。此图中的氨基酸编号是基于成熟fX序列。突出显示用于胰凝乳蛋白酶消化以去除含G1a-结构域的片段(SEQ ID NO.3的氨基酸1-44)和用于fX激活以去除激活肽的切割位点。胰凝乳蛋白酶消化fXa产生缺少1-44氨基酸残基的无G1a结构域fXa(SEQ ID NO.4)。

[0029] 图4展示在使用PPP制备的样品的凝血酶生成中在组织因子的存在下各种浓度的rfVIIa对fXa抑制剂贝曲西班(如下文所述)的抗凝血活性的影响(表示为相对荧光单位(RFU)分析)(如实施例2中所述)。数据显示,rfVIIa和组织因子的组合在高达250nM的浓度下不能完全中和fXa抑制剂贝曲西班的抗凝血活性。

[0030] 图5展示在含活性fXa和贝曲西班的纯化体系中G1a-结构域完整的无水-fXa逆转贝曲西班的fXa抑制作用(空心圆),而与活性fXa相比,仅无水-fXa的促凝血活性可忽略(空心三角)。将fXa发色活性标准化成在无任何抑制剂的情况下的活性fXa(空心正方形)。此更充分地阐述于实施例4中。数据表明,无水-fXa对于fXa底物无活性,但仍保留fXa抑制剂结合能力。

[0031] 图6展示在使用PPP制备的样品的血浆凝血酶生成(表示为相对荧光单位(RFU))分析(如实施例2中所述)中,图5中具有完整G1a结构域的无水-fXa是有效抑制剂。其在约115nM时几乎完全抑制凝血酶生成。数据表明,G1a-结构域未修饰的无水-fXa并不适于用作fXa抑制剂解毒剂。

[0032] 图7展示在96孔板格式中活性fXa的凝血活性在胰凝乳蛋白酶消化之前和在胰凝乳蛋白酶消化15分钟和30分钟之后的比较。如此图中所示,凝血时间(OD405的变化)在fXa被胰凝乳蛋白酶消化15分钟之后明显延迟,且当fXa被消化30分钟时有长达20分钟的时间未观察到凝血。此结果还用于建立胰凝乳蛋白酶消化无水-fXa的条件,这是因为在消化期间可监测到无水-fXa没有活性。此更充分地阐述于实施例1中。

[0033] 图8展示去G1a的无水-fXa对因子Xa抑制剂贝曲西班的结合亲和力,如实施例4中所阐述。数据表明,通过胰凝乳蛋白酶消化无水-fXa而制备以去除含G1a-结构域的片段(残基1-44)的去G1a的无水-fXa能够以与天然fXa类似的亲和力结合贝曲西班($fXa:K_i = 0.12nM$,去G1a的无水-fXa: $K_d = 0.32nM$)。

[0034] 图9展示,在实施例2的使用PPP制备的样品的凝血酶生成分析中,通过添加浓度为680nM的解毒剂(去Gla的无水-fXa)逆转不同浓度贝曲西班的抗凝血活性。在浓度为680nM时,去Gla的无水-fXa能够得到实质上完全的fXa活性恢复。

[0035] 图10展示,在使用PPP制备的样品的凝血延长分析中使用aPTT试剂在96孔板格式(如实施例3中所述),通过不同浓度的解毒剂(去Gla的无水-fXa)逆转250nM贝曲西班的抗凝血活性。数据表明,当使用约608nM的解毒剂来中和250nM的fXa抑制剂贝曲西班时,凝血时间与对照贫血小板血浆的凝血时间相当。

[0036] 图11展示,在使用PPP制备的样品的凝血延长分析中使用aPTT试剂在96孔板格式中,563nM的解毒剂(去Gla的无水-fXa)对依诺肝素(enoxaparin) (0.3125-1.25U/mL)的抗凝血活性的影响,其表示为标准化之后的倍数变化。分析方案阐述于实施例3中。数据表明,添加563nM的解毒剂明显中和低分子量肝素依诺肝素的活性。

[0037] 图12展示在发色分析中解毒剂(去Gla的无水-fXa)对凝血酶(5nM)活性的作用和50nM阿加曲班(argatroban) (一种特异性凝血酶抑制剂) 对其的抑制作用。正如所预期,fXa抑制剂的解毒剂在高达538nM浓度下不会以可检测方式影响凝血酶活性或所述特异性抑制剂阿加曲班对其的抑制作用。此更充分地阐述于实施例14中。

[0038] 图13展示,在aPTT分析中使用标准凝血计时器(standard coagulation timer)通过改变解毒剂去Gla的无水-fXa的浓度对400nM贝曲西班抗凝血活性的影响。分析方案阐述于实施例3中。数据展示,fXa抑制剂的解毒剂实质上逆转了400nM贝曲西班对fXa的抑制作用。据估计,在400nM贝曲西班的情况下,解毒剂的EC₅₀为约656nM。

[0039] 图14展示CHO细胞中用于表达fXa三重突变体(SEQ ID NO.12)的DNA构建体的图。将质粒DNA线性化并转染至CHO dhfr⁻细胞中。使用四氢叶酸酯(HT)缺乏的培养基加甲氨蝶呤(MTX)来选择细胞。通过ELISA来针对高蛋白质表达筛选稳定克隆。在无血清培养基中产生fXa三重突变体并通过离子交换与亲和柱的组合来纯化。图中的编号是基于编码人类fX SEQ ID NO.1的多核苷酸序列进行。例如,活性位点S419(SEQ ID NO.1)处的丙氨酸突变等效于成熟人类fX的S379(SEQ ID NO.3)处的突变,如整个申请案且更具体地实施例7所讨论。

[0040] 图15展示分别使用识别人fX重链和轻链的单克隆抗体的纯化的r-解毒剂的SDS-PAGE和Western印迹。

[0041] 图15A展示离子交换和亲和纯化纯化的r-解毒剂的Western印迹。当将连接轻链和重链的二硫键还原后,r-解毒剂重链迁移到类似于血浆源性fXa的预计分子量。与正常fXa相比,fXa突变体的Gla-结构域中缺失6-39aa使得r-解毒剂轻链的分子量条带较低。

[0042] 图15B和15C展示离子交换和亲和纯化后接大小排阻层析得到的纯化的r-解毒剂的SDS-PAGE和Western印迹。

[0043] 图16展示经口单独施用贝曲西班(15mg/kg)、或经口施用贝曲西班(15mg/kg)然后静脉注射(300ug, IV)根据实施例1制得的血浆源性解毒剂(pd-解毒剂)之后小鼠(n=7-10/组)中的贝曲西班血浆水平。pd-解毒剂是在1.5小时的时间点之前5分钟时施用,并在经口施用贝曲西班之后1.5、2.0和4.0小时时取小鼠血液样品(0.5mL)。分析全血INR、贝曲西班和解毒剂血浆水平。将小鼠血浆中的贝曲西班水平(平均值±SEM)绘示为小鼠在15mg/kg(空心正方形)和15mg/kg接着解毒剂注射(空心圆)之后的时间的函数。在1.5小时时间点

(解毒剂注射后5分钟)解毒剂治疗组的PK-PD相关性汇总于表1中。根据INR测量值,单次注射解毒剂使功能性贝曲西班减少>50%。此更充分地阐述于实施例8中。

[0044] 图17展示利用经纯化r-解毒剂进行小鼠实验(n=4-10/组)的结果。比较经口单独施用贝曲西班(15mg/kg)或经口施用贝曲西班(15mg/kg)然后静脉注射(300ug) r-解毒剂之后小鼠血浆中的贝曲西班水平(图17A)和全血INR(图17B)。标明各治疗组的平均值。如表2中所汇总,单次静脉注射r-解毒剂使得离体全血INR有>50%校正,此证明经由单次或多次注射或其它方案解毒剂有效中和fXa抑制剂。这些结果表明,本发明的fXa变体具有充当普适解毒剂在具有出血或其它医疗紧急状况的患者中逆转fXa抑制剂的抗凝血作用的潜力。此更充分地阐述于实施例8中。

[0045] 图18展示在96孔浊度变化凝血分析中r-解毒剂逆转依诺肝素的抑制作用。这些结果基本上类似于pd-解毒剂(图11),此表明两种fXa衍生物均具有相当的功能性解毒剂活性。508nM r-解毒剂实质上校正了(>75%)1.25U/mL依诺肝素的抑制作用。分析方案呈现于实施例11中。

[0046] 图19展示r-解毒剂逆转低分子量肝素(LMWH)的抑制作用,如在人类血浆凝血分析中所测试。图18和19二者均于实施例11中讨论。

[0047] 图20展示r-解毒剂逆转利伐沙班的抗凝血作用。此更充分地讨论于实施例12中。

[0048] 图21展示r-解毒剂的多核苷酸序列和经翻译多肽序列的排列。

[0049] 图22展示在单次静脉注射(1次注射)或两次注射(2次注射)r-解毒剂的情况下小鼠实验(n=5/组,312ug/200ul r-解毒剂)的结果。对经口施用贝曲西班(15mg/kg)之后静脉注射运载体或r-解毒剂之后的血浆中的贝曲西班水平进行比较(图22A)(参见实施例8的详细阐述)。如图22A中所示,与运载体对照(对照1)相比,单次静脉注射r-解毒剂使血浆中的贝曲西班水平增加8倍以上,此表明解毒剂在体内有效结合贝曲西班的能力。与单次注射相比,第二次注射解毒剂又使贝曲西班水平增加不到2倍,此表明在小鼠血液中贝曲西班的数量有限且其抗凝血作用被解毒剂逆转。图22B表明,单次和双次注射解毒剂之后,所测量的INR随小鼠血浆中解毒剂/贝曲西班的比例的增加而降低。

[0050] 图23展示使用r-解毒剂逆转利伐沙班(A)、贝曲西班(B)和阿哌沙班(C)对fXa的抑制。使用DynaFit和Graphpad Prism软件进行曲线拟合和数据分析(实施例15)。

[0051] 图24展示人类血浆中r-解毒剂对利伐沙班的PT延长的逆转(实施例16)。

[0052] 图25展示阿哌沙班的PT延长而添加r-解毒剂逆转其抗凝血作用(实施例16)。

[0053] 图26展示r-解毒剂对依诺肝素抗凝血作用的逆转(实施例17)。

[0054] 图27展示大鼠中静脉施用r-解毒剂对利伐沙班诱导的抗凝血的剂量响应逆转(实施例18)。

[0055] 图28展示r-解毒剂给药到抗凝血化(anticoagulated)大鼠中时对利伐沙班游离(未结合)部分的剂量响应减少(实施例19)。

[0056] 图29A和B展示通过全血INR和PT比率测量的大鼠中IV施用r-解毒剂对利伐沙班诱导的抗凝血的持续逆转(实施例20)。

[0057] 图30展示麻醉大鼠中依诺肝素的剂量范围研究(实施例21)。

[0058] 图31展示通过活化的部分促凝血酶原激酶时间测量的大鼠中IV施用r-解毒剂和硫酸鱼精蛋白对依诺肝素诱导的抗凝血的持续逆转(实施例21)。

[0059] 图32展示施用r-解毒剂对贝曲西班诱导的抗凝血的持续逆转(实施例22)。

[0060] 图33展示Sprague-Dawley大鼠中1mg静脉给药之后r-解毒剂的血浆浓度-时间概貌(实施例23)。

[0061] 图34展示恒河猴中10mg静脉给药之后r-解毒剂的血浆浓度-时间概貌(实施例24)。

[0062] 图35A和35B展示施用r-解毒剂中和利伐沙班活性的模拟时间进程曲线。在图35A中,400mg剂量的r-解毒剂(推注给药)逆转20mg剂量的利伐沙班,同时假设R-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为3小时。在图35B中,使用900mg剂量的R-解毒剂(推注加6小时输注)逆转20mg剂量的利伐沙班,同时假设R-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为1小时(实施例25)。

[0063] 图36A和36B展示r-解毒剂中和贝曲西班活性的模拟时间进程曲线。在图36A中,400mg剂量的r-解毒剂(推注给药)逆转80mg剂量的贝曲西班,同时假设r-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为3小时。在图36B中,使用900mg剂量的r-解毒剂(推注加6小时输注)逆转80mg剂量的贝曲西班,同时假设r-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为1小时(实施例26)。

[0064] 图37展示r-解毒剂逆转利伐沙班抗凝血的效果(实施例27)。

[0065] 图38展示大鼠中施用r-解毒剂对依诺肝素抗凝血引起的血液损失的逆转(实施例28)。每一处理组中单个动物的血液损失如图41所示。

[0066] 图39展示大鼠中施用r-解毒剂对磺达肝素抗凝血引起的血液损失的逆转(实施例28)。每一处理组中单个动物的血液损失如图43所示。

[0067] 图40展示施用r-解毒剂对依诺肝素抗凝血引起的抗凝的逆转。以血浆抗-fXa单位测量抗凝血(实施例29)。

[0068] 图41展示大鼠中施用r-解毒剂对依诺肝素抗凝血引起的血液损失的剂量响应减轻(实施例28)。

[0069] 图42展示大鼠尾部横切模型(实施例28)中测量的血液损失与通过抗-fXa单位测量的依诺肝素浓度间的相关性(实施例29)。

[0070] 图42a展示由于依诺肝素浓度提高到超过1.5U/ml(通过抗-fXa单位分析测量)在血液损失上的一个急剧增加。

[0071] 图42b展示血液损失与r-解毒剂浓度间的相关度分析, r^2 值为0.799。

[0072] 图42c展示抗-fXa单位与r-解毒剂浓度间的相关度分析, r^2 值为0.689。

[0073] 图43展示大鼠尾部横切模型中(实施例28)r-解毒剂而非鱼精蛋白对磺达肝素抗凝血造成的血液损失的逆转。

[0074] 图44展示通过抗-fXa活性分析测量的磺达肝素造成的抗凝血的逆转。

[0075] 详细描述

[0076] I. 定义

[0077] 除非另有说明,否则本发明的实践将使用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术,此在所属领域的技术人员的范围内。参见例如 Sambrook and Russell编辑(2001)分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第3版;Ausubel等人编辑(2007)最新分子生物学实验方法汇编(Current Protocols in Molecular Biology)系列;酶学方法(Methods in Enzymology)系列(学术出版社公司(Academic Press, Inc.),纽约(N.Y.));MacPherson等人(1991)PCR

1:实用方法 (PCR 1:A Practical Approach) (牛津大学出版社 (Oxford University Press) 的 IRL Press); MacPherson 等人 (1995) PCR 2:实用方法 (PCR 2:A Practical Approach); Harlow and Lane 编辑 (1999) 抗体, 实验室手册 (Antibodies, A Laboratory Manual); Freshney (2005) 动物细胞的培养: 基本技术手册 (Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique), 第5版; Gait 编辑 (1984) 寡核苷酸的合成 (Oligonucleotide Synthesis); 美国专利第4,683,195号; Hames 和 Higgins 编辑 (1984) 核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization); Anderson (1999) 核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization); Hames and Higgins 编辑 (1984) 转录和翻译; 固定化细胞和酶 (Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes) (IRL Press (1986)); Perbal (1984) 分子克隆实验指南 (A Practical Guide to Molecular Cloning); Miller and Calos 编辑 (1987) 哺乳动物细胞的基因转移载体 (Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells) (冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory)); Makrides 编辑 (2003) 哺乳动物细胞的基因转移和表达 (Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells); Mayer and Walker 编辑 (1987) 细胞核分子生物学中的免疫化学方法 (Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology) (学术出版社 (Academic Press), 伦敦 (London)); Herzenberg 等人编辑 (1996) 韦尔的实验免疫学手册 (Weir's Handbook of Experimental Immunology); 小鼠胚胎操作实验指南 (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual), 第3版 (冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (2002))。

[0078] 所有包括范围在内的数值指定 (例如, pH、温度、时间、浓度、和分子量) 都是近似值, 其以 (+) 或 (-) 0.1 的增量变化。应了解, 尽管不一定明确陈述, 但是所有数值指定前面皆有术语“约”。还应该了解, 尽管未必明确陈述, 本文所述的试剂仅是例示性的且这些试剂的等效物已为此项技术习知。

[0079] 除非上下文另有明确说明, 否则说明书和权利要求书中使用的单数形式“一个/一种 (a, an)”和“所述的 (the)”包括复数意义。例如, 术语“药学上可接受的载体”包括多种药学上可接受的载体, 包括其混合物。

[0080] 本文所用术语“包含/包括”意欲指组合物和方法包括所列举要素, 但并不排除其它要素。当使用“基本上由...组成”定义组合物和方法时, 将意味着出于所想要的用途不包括对所述组合有任何本质意义的其它要素。因此, 基本上由本文所定义的要素组成的组合物不会将来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体 (例如磷酸盐缓冲的盐水、防腐剂、和诸如此类) 排除在外。“由...组成”将意味着排除其它成分的超过痕量的元素和用于施用本发明组合物的实质性方法步骤。通过这些过渡术语中的每一者定义的实施例均在本发明的范围内。

[0081] 诊断或治疗的“受试者”是细胞或哺乳动物, 包括人类。诊断或治疗的非人类动物受试者包括, 例如, 鼠科动物 (例如大鼠、小鼠)、犬科动物 (canine) (例如狗)、兔科动物 (例如家兔)、家畜、运动动物和宠物。

[0082] 术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用且在其最广泛意义上是指两个或两个以上的亚单位氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物的化合物。所述亚单位可通过肽键连接。在另一实施例中, 所述亚单位可通过其它键 (例如, 酯、醚、氨基等) 连接。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸且对蛋白质或肽序列中可包含的氨基酸的最大数量并无限制。本文所用术语“氨

基酸”涉及天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,其包括甘氨酸和D与L光学异构体二者、氨基酸类似物和肽模拟物。天然存在的氨基酸的单个字母和三个字母缩写列示于下文中。如果肽链短,通常将三个或三个以上氨基酸的肽称为寡肽。如果肽链较长,则通常将所述肽称为多肽或蛋白质。

[0083]

1-字母	3-字母	氨基酸
Y	Tyr	L-酪氨酸
G	Gly	L-甘氨酸
F	Phe	L-苯丙氨酸
M	Met	L-甲硫氨酸
A	Ala	L-丙氨酸

[0084]

1-字母	3-字母	氨基酸
S	Ser	L-丝氨酸
I	Ile	L-异亮氨酸
L	Leu	L-亮氨酸
T	Thr	L-苏氨酸
V	Val	L-缬氨酸
P	Pro	L-脯氨酸
K	Lys	L-赖氨酸
H	His	L-组氨酸
Q	Gln	L-谷氨酰胺
E	Glu	L-谷氨酸
W	Trp	L-色氨酸
R	Arg	L-精氨酸
D	Asp	L-天冬氨酸
N	Asn	L-天冬酰胺
C	Cys	L-半胱氨酸

[0085] “因子Xa”或“fXa”或“fXa蛋白质”是指血液凝血途径中的丝氨酸蛋白酶,其由非活性因子X(fX)产生。因子Xa是由因子IXa与其辅因子因子VIIIa(其呈称为固有Xase的复合物形式)、或因因子VIIa与其辅因子组织因子(其呈非固有Xase的复合物形式)激活。fXa与因子Va形成膜结合凝血酶原酶复合物且是催化凝血酶原至凝血酶的转化的凝血酶原酶复合物的活性组份。凝血酶是催化纤维蛋白原至纤维蛋白的转化的酶,这最终导致血凝块形成。因此,在本文中fXa的生物活性有时称为“促凝血活性”。

[0086] 编码人类因子X(“fX”)的核苷酸序列可在<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>的基因库(GenBank)中作为“NM_000504”找到,且列示于图1b和SEQ ID No.2。fX的对应氨基酸序列和结构域结构阐述于Leytus等人,Biochemistry,1986,25:5098-5102中。成熟fX的结构域结构也阐述于Venkateswarlu,D.等人,生物物理学杂志(Biophysical Journal),2002,82:1190-1206中。

当重链的前52个残基(SEQ ID NO.3的氨基酸143至194)催化切割时,fX被活化成fXa(SEQ ID NO.6)。FXa含有轻链(SEQ ID NO.8)和重链(SEQ ID NO.9)。轻链的前45个氨基酸残基(SEQ ID NO.6的残基1-45)称为Gla结构域,因为其含有11个翻译后修饰的 γ -羧基谷氨酸残基(Gla)。其还含有一个短(6个氨基酸残基)芳香族堆栈序(SEQ ID NO.6的残基40-45)。胰凝乳蛋白酶消化选择性去除1-44个残基,此获得无Gla结构域的fXa(SEQ ID NO.4)。fXa的丝氨酸蛋白酶催化结构域位于C-末端重链。fXa的重链与其它丝氨酸蛋白酶(例如凝血酶、胰蛋白酶和经活化蛋白质C)高度同源。

[0087] 成熟因子X的结构域结构可在Venkateswarlu D.等人,生物物理学杂志(Biophysical J.),2002,82,1190-1206中找到,其整体内容以引用的方式并入本文中。此图中的氨基酸编号与图3中的编号相同。将轻链连接至激活肽的三肽Arg140-Lys141-Arg142(图1中所示的RKR(SEQ ID NO.16)三联体)由于在循环血浆中缺少三肽的形式占主导地位,所以并未展示所述三肽。个别结构域展示于方框中。此包括图2中的氨基酸1-45(SEQ ID NO.3)。在功能上重要的催化残基上画圈,且“ γ ”代表Gla(γ -羧基谷氨酸)残基。

[0088] “天然fXa”或“野生型fXa”是指天然存在于血浆中或以其原始未经修饰形式分离的fXa,所述fXa具有活化凝血酶原的生物活性,且因此促进形成血凝块。所述术语包括从组织样品中分离的天然存在的多肽以及重组产生的fXa。“活性fXa”是指具有活化凝血酶原的生物活性的fXa。“活性fXa”可为天然fXa或经修饰保留促凝血活性的fXa。

[0089] “fXa衍生物”或“经修饰的fXa”或“因子Xa蛋白质的衍生物”是指已经修饰以便直接或间接结合至因子Xa抑制剂且不会组装成凝血酶原酶复合物的fXa蛋白质。结构上,所述衍生物经修饰以不提供促凝血活性或提供降低的促凝血活性。“促凝血活性”在本文中是指试剂能够造成血液凝血或凝块形成的能力。降低的促凝血活性意味着在相同时间段内与野生型fXa相比,促凝血活性降低至少约50%、或超过约90%、或超过约95%。例如,重组fX-S395A基本上不具有促凝血活性,如通过体外分析(例如fXa活性分析)所测量。

[0090] 所述衍生物具有经修饰的活性位点或经修饰的Gla结构域或二者。亦涵盖额外的修饰。预计所述修饰可以一种或多种的以下方式来实施:从序列缺失一个或多个的氨基酸、利用一个或多个的不同氨基酸残基取代一个或多个的氨基酸残基、和/或操纵一个或多个的氨基酸侧链或其“C”或“N”末端。

[0091] 术语“活性位点”是指酶或抗体发生化学反应的部分。“经修饰的活性位点”是结构上已经修饰的活性位点以为所述活性位点提供增加或减少的化学反应性或特异性。活性位点的实例包括(但不限于)人类因子X包含235-488氨基酸残基的催化结构域(图1)、和人类因子Xa包含195-448氨基酸残基(图2和3)的催化结构域。经修饰的活性位点的实例包括(但不限于)人类因子Xa包含在SEQ ID NO.10、11、12、13、或15中195-448氨基酸残基且在位置Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414、或Arg424处具有至少一个氨基酸取代的催化结构域。

[0092] 如上所述,本发明的衍生物可具有经修饰Gla结构域或整个Gla结构域已去除。适于在本发明方法中用作解毒剂的fXa衍生物的实例是无Gla结构域的fXa(SEQ ID NO.4或5)、Gla-缺陷的fXa(SEQ ID NO.7,具有本文所述修饰)、在催化位点处具有修饰的fXa(SEQ ID NO.10或11)、和在习知对于fV/fVa相互作用或fVIII/fVIIIa相互作用而言重要的位点处具有修饰的fXa(SEQ ID NO.4、5、7、10、或11,在位置Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414

或Arg424处具有至少一个氨基酸取代),如本文详细阐述。本发明所涵盖的fXa衍生物的其它实例提供于下文中。

[0093] “无Gla结构域的fXa”或“去Gla的fXa”是指不具有Gla-结构域的fXa且涵盖除了去除Gla-结构域以外具有其它修饰的fXa衍生物。本发明中无Gla结构域的fXa的实例包括(但不限于)缺少SEQ ID NO.3的1-39氨基酸残基的fXa衍生物;缺少SEQ ID NO.3的6-39氨基酸残基的fXa衍生物,其对应于如下文更详细阐述表达于CHO细胞中的fXa突变体(SEQ ID NO.12,表24);缺少SEQ ID NO.3的1-44氨基酸残基的fXa衍生物,其对应于胰凝乳蛋白酶消化人类fXa之后的去Gla的fXa(SEQ ID NO.4,图3);和缺少SEQ ID NO.3的整个1-45Gla-结构域残基的fXa衍生物(如Padmanabhan等人,分子生物学杂志(Journal Mol.Biol.,1993,232:947-966中所述)(SEQ ID NO.5)。其它实例包括去Gla的无水fXa(SEQ ID NO.10,表22)和去Gla的fXa-S379A(SEQ ID NO.11,表23)。

[0094] 在一些实施例中,去Gla的fXa至少包含SEQ ID NO.3的氨基酸残基40至448或其等效物。在一些实施例中,去Gla的fXa至少包含SEQ ID NO.3的氨基酸残基45至488(SEQ ID NO.4)或46至488(SEQ ID NO.5)或其等效物。

[0095] 在一些实施例中,去Gla的fXa至少包含SEQ ID NO.3的氨基酸残基40至139和195至448或其等效物。在一些实施例中,去Gla的fXa至少包含SEQ ID NO.3的氨基酸残基45至139和195至448或其等效物。在另一实施例中,去Gla的fXa至少包含SEQ ID NO.3的氨基酸残基46至139和195至448或其等效物。

[0096] “Gla缺陷的fXa”是指在其Gla结构域中游离侧链 γ -羧基数量降低的fXa。如同无Gla结构域的fXa一样,Gla缺陷的fXa也可具有其它修饰。Gla缺陷的fXa包括未羧化、羧化不全和经脱羧的fXa。“未羧化的fXa”或“脱羧的fXa”是指不具有Gla结构域的 γ -羧基谷氨酸残基的 γ -羧基的fXa衍生物,例如所有Gla结构域 γ -羧基谷氨酸均被不同氨基酸置换的fXa、或所有侧链 γ -羧基均通过诸如胺化、酯化等方式去除或遮蔽的fXa。对于重组表达的蛋白质,未羧化fXa有时也称为非羧化fXa。“羧化不全fXa”是指与野生型fXa相比Gla结构域中 γ -羧基的数量降低的fXa衍生物,例如一个或多个但并非其所有Gla结构域 γ -羧基谷氨酸由一个或多个的不同氨基酸置换的fXa、或至少一个但并非其所有侧链 γ -羧基通过诸如胺化和酯化等方式去除或遮蔽的fXa。

[0097] 人类无Gla结构域因子Xa的结构域结构可在Padmanabhan等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),1993,232,947-966中找到,其以整体内容引用的方式并入本文中。氨基酸的编号是基于与胰凝乳蛋白酶拓扑等价的,其中例如,当使用人类成熟fX编号时,Ser195对应于图2中的Ser379。插入用字母表示,且缺失由2个连续编号表示。将300添加到轻链编号中以与重链编号相区别。 β 363是 β -羟基天冬氨酸。斜线表示在结晶物质中观察到的蛋白水解切割。基于成熟fX(SEQ ID NO.3)且缺少1-45氨基酸残基的无Gla结构域fXa的序列列示于SEQ ID NO.5中。

[0098] 在一个实施例中,fXa衍生物可缺少fXa的轻链,但仍含有重链中存在的丝氨酸蛋白酶催化结构域。此外,具有其它丝氨酸蛋白酶催化结构域的嵌合体可用于在重链中进行取代。

[0099] “pd-解毒剂”或“血浆源性解毒剂”是指去Gla的无水fXa衍生物且具有SEQ ID NO.10的氨基酸残基。

[0100] “r-解毒剂”或“重组解毒剂”是指缺少SEQ ID NO.3的6-39氨基酸残基的fXa衍生物,其对应于如下文更详细阐述表达于CHO细胞中并除去接头的fXa突变体(SEQ ID NO.13,表25)。

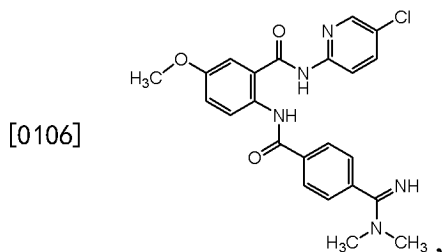
[0101] “抗凝血试剂”或“抗凝血剂”是抑制血凝块形成的试剂。抗凝血试剂的实例包括(但不限于)凝血酶的特异性抑制剂、因子IXa、因子Xa、因子XIa、因子XIIa或因子VIIa、肝素和衍生物、维生素K拮抗剂、和抗组织因子抗体。凝血酶的特异性抑制剂的实例包括水蛭素(hirudin)、比伐卢定(bivalirudin)(安高玛斯(Angiomax®))、阿加曲班和来匹卢定(lepirudin)(瑞福丹(Refludan®))。肝素和衍生物的实例包括未经分级分离的肝素(UFH)、低分子量肝素(LMWH),例如依诺肝素(依诺肝素(enoxapaine),克赛(Clexane®),莱沃诺斯(Lovenox®)等)、达特肝素(dalteparin)(法安明(Fragmin®))、那屈肝素(nadroparin)(速碧林(Fraxiparin, Fraxiparine)等)、亭扎肝素(tinzaparina)(Innohep)、阿地肝素(ardeparin)(Normiflo)、舍托肝素(certoparin)(sandoparin, emborex,等),和达那肝素(danaparoid)(类肝素剂(Organon®));和合成戊糖(例如磺达肝素(阿瑞斯塔(Arixtra®))、依达肝素(idraparinux)、艾比肝素(idradbiotaparinux)和生物素化依达肝素。维生素K拮抗剂的实例包括华法林(warfarin)(香豆定(Coumadin®))、苯硝香豆醇(phenocoumarol)、醋硝香豆醇(acenocoumarol)(斯托姆(Sintrom®))、氯茛二酮(clorindione)、双香豆素(dicumarol)、二苯茛酮(diphenadione)、双香豆乙酯(ethyl biscoumacetate)、苯丙香豆素(phenprocoumon)、苯茛二酮(phenindione)、和噻氯香豆素(tiocloamarol)。在一个实施例中,抗凝血剂是因子Xa的抑制剂。在一个实施例中,抗凝血剂是贝曲西班。

[0102] “抗凝血疗法”是指向患者施用以防止不期望的血凝块或血栓形成的治疗方案。抗凝血疗法包含以适于治疗或防止患者中不期望血凝块或血栓形成的剂量和计划表施用一种抗凝血试剂或两种或两种以上的抗凝血试剂或其它试剂的组合。

[0103] 术语“因子Xa抑制剂”或“因子Xa的抑制剂”是指在体外和/或体内可直接或间接抑制凝血因子Xa催化凝血酶原至凝血酶的转化的活性的化合物。已知fXa抑制剂的实例包括(但不限于)依度沙班(edoxaban)、磺达肝素、依达肝素、生物素化的依达肝素、依诺肝素、法安明、NAP-5、rNAPc2、组织因子途径抑制剂、DX-9065a(如例如Herbert, J.M.等人,药理学与实验治疗学杂志(J Pharmacol Exp Ther.) 1996276(3):1030-8中所阐述)、YM-60828(如例如Taniuchi, Y.等人,血栓形成和止血(Thromb Haemost.) 199879(3):543-8中所阐述)、YM-150(如例如Eriksson, B.I.等人,血液(Blood) 2005;106(11),摘要1865中所阐述)、阿哌沙班(apixaban)、利伐沙班、PD-348292(如例如调查报告:抗血栓剂-进入预防药市场(Pipeline Insight:Antithrombotics-Reachingthe Untreated Prophylaxis Market), 2007中所阐述)、奥米沙班(otamixaban)、雷扎沙班(razaxaban)(DPC906)、BAY 59-7939(如例如Turpie, A.G.等人,血栓形成和止血杂志(J.Thromb.Haemost.) 2005,3(11):2479-86中所阐述)、依度沙班(如例如Hylek EM,研发中药物的新见(Curr Opin Invest Drugs) 20078(9):778-783中所阐述)、LY517717(如例如Agnelli, G.等人,血栓形成和止血杂志(J.Thromb.Haemost.), 20075(4):746-53中所阐述)、GSK913893、贝曲西班(如下文所述)和其衍生物。也将低分子量肝素(“LMWH”)视为因子Xa抑制剂。

[0104] 在一个实施例中,因子Xa抑制剂选自贝曲西班、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、LMWH、和它们的组合。

[0105] 术语“贝曲西班”是指化合物“[2-(4-[(二甲基氨基)亚氨基甲基]苯基)羰基氨基)-5-甲氧基苯基]N-(5-氯(2-吡啶基))羧酰胺”或其药学上可接受的盐。“[2-(4-[(二甲基氨基)亚氨基甲基]苯基)羰基氨基)-5-甲氧基苯基]N-(5-氯(2-吡啶基))羧酰胺”是指具有以下结构的化合物:



[0107] 或其互变异构体或药学上可接受的盐。

[0108] 贝曲西班阐述于美国专利第6,376,515号、第6,835,739号和第7,598,276号,其内容以引用的方式并入本文中。已知贝曲西班是因子Xa的特异性抑制剂。

[0109] 本文所用术语“解毒剂”或“因子Xa抑制剂的解毒剂”是指可通过与活性fXa竞争以与可用fXa抑制剂结合来实质上中和或逆转fXa抑制剂的凝血抑制活性的分子(例如fXa的衍生物)。本发明解毒剂的实例是具有降低的磷脂膜结合的fXa衍生物(例如去G1a的fXa或G1a缺陷的fXa)、和具有降低的催化活性的fXa衍生物(例如活性位点经修饰的fXa衍生物)、和与fV/Va、或fVIII/fVIIIa的相互作用降低的衍生物。本发明具有降低的磷脂膜结合和具有降低的催化活性的解毒剂的实例包括(但不限于)通过胰凝乳蛋白酶消化无水-fXa获得的去G1a的无水-fXa(如实施例1中所述);通过诱变获得的去G1a的fXa-S379A(胰凝乳蛋白酶编号中的S195A)(如实施例6中所述)。

[0110] 本发明解毒剂的其它实例包括含有丝氨酸蛋白酶催化结构域的蛋白质或多肽,所述丝氨酸蛋白酶催化结构域与fXa催化结构域具有足够的结构相似性且因此能够结合小分子fXa抑制剂。实例包括(但不限于)结合至fXa抑制剂GSK913893的凝血酶(Young R.等人,生物有机药物化学快报(Bioorg.Med.Chem.Lett.) 2007,17(10):2927-2930);结合至fXa抑制剂阿哌沙班的血浆激肽释放酶(Luettgen J.等人,血液(Blood),2006,108(11)摘要4130);和以亚纳摩尔亲和力($K_d=500\text{pM}$)结合fXa抑制剂C921-78的胰蛋白酶(或其细菌同系物枯草杆菌蛋白酶)(BetzA等人,生物化学(Biochem.),1999,38(44):14582-14591)。

[0111] 在一个实施例中,本发明的衍生物直接或间接结合至因子Xa抑制剂。本文所用的术语“结合(binding,binds)”、“识别(recognition,recognize)”是指包括可使用(例如)杂交分析检测的分子间相互作用。该术语还指包括分子间的“结合”相互作用。相互作用可为(例如)自然界中的蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸、蛋白质-小分子或小分子-核酸。结合可为“直接”或“间接”。“直接”结合包含分子间的直接物理接触。分子间的“间接”结合包含同时直接物理接触一种或多种中间分子的分子。例如,预计本发明的衍生物间接结合并实质上中和低分子量肝素和因子Xa的其它间接抑制剂。此结合可使得形成包含相互作用分子的“复合物”。“复合物”是指通过共价键和/或非共价键、相互作用和/或力将两种或两种以上的分子的结合保持在一起。

[0112] “中和”、“逆转”、“校正”或“对抗”fXa抑制剂的活性或类似词语是指抑制或阻断fXa抑制剂的因子Xa抑制或抗凝血功能。所述词语是指在体外和/或体内部分抑制或阻断所述功能、以及抑制或阻断大部分或所有fXa抑制活性。这些术语也指校正fXa抑制剂依赖性药效或替代标志物的至少约20%。标志物的例子包括,但不限于,INR、PT、aPTT、ACT、抗fXa单位、凝血酶生成(Technothrombin TGA、凝血弹性描记法(thromboelastography)、自动校正凝血酶曲线法(calibrated automated thrombogram,CAT))和类似物。

[0113] 在某些实施例中,因子Xa抑制剂被实质上中和(或者如上所述的被“校正”)是指其直接或间接抑制因子Xa的能力降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。

[0114] 术语“磷脂膜结合”是指活性fXa在Ca²⁺离子的存在下结合至带负电荷的磷脂膜或其它细胞膜(例如血小板)的能力。此结合通过fXa的Gla结构域中的γ-羧基谷氨酸残基调介。

[0115] 术语“降低的相互作用”是指fXa衍生物与离子或通常与野生fXa结合或复合的其它辅因子结合或形成复合物的能力降低。所述相互作用的实例包括(但不限于)fXa与Ca²⁺离子和磷脂膜结合、与fV/fVa或fVIII/f/VIIIa等的相互作用。优选地,fXa衍生物与离子或其它辅因子的相互作用降低至野生fXa相互作用的50%。更优选地,相互作用降低至野生型fXa相互作用的10%、1%和0.1%。这是指所述衍生物“组装成凝血酶原酶复合物”的能力。

[0116] “fXa抑制剂结合活性”是指分子结合fXa的抑制剂的能力。本发明的解毒剂具有fXa抑制剂结合活性,无论是直接还是间接。

[0117] 术语“循环半寿期”或“血浆半寿期”是指单次施用或停止输注之后在血浆中循环的解毒剂的血浆浓度降低至其初始浓度的一半所需的时间。

[0118] 术语“偶联部分”是指可通过与fXa衍生物的残基形成共价键添加至所述fXa衍生物的部分。所述部分可直接键合至fXa衍生物的残基或可与接头形成共价键,所述接头进而与fXa衍生物的残基形成共价键。

[0119] 如本文所用,“抗体”包括整个抗体和其任何抗原结合片段或单链。因此术语“抗体”包括含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的任何蛋白质或肽。其实例包括(但不限于)重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区、或其任一部分、或结合蛋白质的至少一部分。

[0120] 抗体可为多克隆或单克隆抗体且可自任何适宜生物来源(例如,鼠科动物、大鼠、绵羊和犬科动物)分离。

[0121] “组合物”意欲指活性剂与另一种惰性(例如,可检测剂或标记)或活性(例如佐剂)的化合物或组合物的组合。

[0122] “医药组合物”意欲包括活性剂与惰性或活性载体的组合,以使得所述组合物适于在体外、体内或离体诊断或治疗使用。

[0123] “有效量”是指衍生物足以诱导期望的生物和/或治疗结果的量。所述结果可为缓解疾病的体征、症状或病因,或生物系统的任何其它期望变化。在本发明中,所述结果通常应涉及一种或多种的以下结果:中和已向患者施用的fXa抑制剂、逆转fXa抑制剂的抗凝血活性、自血浆中去除fXa抑制剂、恢复止血、和出血减少或停止。有效量将根据以下因素而变:所用特定解毒剂、向受试者施用的特定fXa抑制剂、fXa抑制剂的给药方案、解毒剂的施

用时机、受试者和正治疗的疾病状况、受试者的重量和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式和诸如此类,所有这些都可由所属领域的技术人员容易地确定。一种确定是否获得生物或治疗结果的方法是测量患者体内fXa抑制剂依赖性药效或替代标志物。所述标志物可以是,但不限于,INR、PT、aPTT、ACT、抗fXa单位、和凝血酶生成(Technothrombin TGA、凝血弹性描记法(thromboelastography)、自动校正凝血酶曲线法(calibrated automated thrombogram,CAT))。

[0124] 术语“中和量”是指能够中和因子Xa抑制剂的量,其中术语“中和”是如本文所定义的。

[0125] 如本文所用,本文中使用的术语“治疗/处理(treating,treatment)”和诸如此类以指获得期望的药理学和/或生理学作用。此作用就完全或部分地预防病症或其体征或症状来说可为预防性的,和/或就部分或完全治愈病症和/或由所述病症造成的副作用来说是治疗性的。

[0126] “治疗/处理”还涵盖哺乳动物病症的任何治疗,且包括:(a)防止可能易造成病症、但可能还未诊断出患有所述病症的受试者出现所述病症,例如,防止抗凝血剂服药过量的患者出血;(b)抑制病症,即,终止其发展,例如,抑制出血;或(c)减缓或改善病症,例如,减少出血。

[0127] 如本文所用,“治疗/处理”进一步包括全身性改善与病理学有关的症状和/或延迟症状的发作。“治疗/处理”的临床和亚临床证据将随病理学、个体和治疗/处理而变。

[0128] “施用”可在整个治疗过程中连续或间歇地以一次给药实施。确定最有效的施用方法和剂量的方法已为所属领域的技术人员所知且应随用于治疗的组合物、治疗的目的、所治疗的靶细胞和所治疗的受试者而变化。可根据治疗医师所选择的剂量水平和模式实施单次或多次施用。适宜剂量制剂和施用试剂的方法已为本领域所知。

[0129] 本发明的试剂和组合物可用于制造医药并通过根据常规程序施用(例如活性成分存于医药组合物中)来治疗人类和其它动物。

[0130] 本发明的试剂可通过任何适宜途径施用、特定地通过胃肠外(包括皮下、肌肉、静脉内和真皮内)施用用于治疗。还应了解,优选途径将随接受者的状况和年龄、和所治疗的疾病而变。

[0131] 可以通过许多体外分析(例如凝血酶生成分析)和抗fXa单位,和临床凝血分析(例如aPTT、PT和ACT)来确定能否达成所述方法(即,抑制或逆转因子Xa抑制剂)。

[0132] 本文针对核酸(例如DNA或RNA)所用于的术语“分离的”是指分别从存在于大分子天然源中的其它DNA或RNA分离出的分子。术语“分离的核酸”意欲包括并非天然作为片段存在且不可能以天然状态找到的核酸片段。术语“分离的”在本文中还可用于指从其它细胞蛋白分离出的多肽和蛋白质且意欲涵盖经纯化多肽和重组多肽二者。在其它实施例中,术语“分离的”是指从构成部分、细胞及其它部分分离,其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然界中通常呈结合状态。例如,分离的细胞是从不同表型或基因型的组织或细胞分离出的细胞。所属领域的技术人员应了解,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”以将其与其天然存在的对应物相区别。

[0133] 当本文所用术语“其等效物”是指参考蛋白质、多肽或核酸时,其意指那些具有最小同源性同时仍保留期望功能性者。预计本文所提及的任何经修饰蛋白质也包括其等效

物。例如,同源性可为至少75%同源性,且另一选择为至少80%,或另一选择为至少85%,或另一选择为至少90%,或另一选择为至少95%,或另一选择为98%同源性且展示实质上与参考多肽或蛋白质等效的生物活性。多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)与另一序列具有一定百分数(例如,80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”意味着当进行比对时,将两个序列相比时相同碱基(或氨基酸)的百分数。应注意,当仅使用fXa(或相关丝氨酸蛋白酶)的重链时,整体同源性可能低于75%(例如,65%或50%),然而,仍保留期望功能性。此比对和%同源性或序列同一性可使用本领域中已知的软件程序进行确定,例如那些在分子生物学实验手册(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)(F.M.Ausubel等人编辑,1987)增刊30,第7.7.18节,表7.7.1中所阐述。优选地,使用默认参数进行比对。优选的比对程序是BLAST,使用缺省参数。具体来说,优选程序是BLASTN和BLASTP,其使用以下缺省参数:遗传密码=标准;筛选(filter)=无;链=两条链;截止=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50序列;分类依据=高分;数据库=非冗余,基因库+EMBL+DDBJ+PDB+基因库CDS翻译库+瑞士蛋白(SwissProtein)+SPupdate+PIR。这些程序的细节可在以下互联网地址中找到:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>。

[0134] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用且是指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物)的聚合形式。多核苷酸可具有任何三维结构且可执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、具支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的经分离DNA、任何序列的经分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。若存在,对核苷酸结构的修饰可在多核苷酸组装之前或之后进行。核苷酸的序列可插入非核苷酸组份。多核苷酸可在聚合之后进一步修饰,例如通过与标记组份偶联。所述术语还指双链和单链分子二者。除非另外指明或需要,否则本发明为多核苷酸的任何实施例涵盖双链形式和两个已知或预计组成双链形式的互补单链形式中的任一者两种形式。

[0135] 多核苷酸是由4种核苷酸碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);胸腺嘧啶(T);和当多核苷酸为RNA时其替代胸腺嘧啶的尿嘧啶(U)。因此,术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表现形式。此字母表现形式可输入具有中央处理单元的电脑中的数据库中并用于生物信息学应用(例如功能基因组学和同源性搜索)。

[0136] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较每一序列中的位置来测定,所述每一序列可为比较目的而进行比对。当所比较序列中的位置被相同碱基或氨基酸占据时,则分子在此位置处同源。序列间同源性的程度是匹配或所述序列所共有的同源位置的数量的函数。“无关”或“非同源”序列与本发明序列之一具有小于40%同一性、或另一选择小于25%同一性。

[0137] 多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)与另一序列具有某一百分数(例如,60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的“序列同一性”意味着当进行比对时,两个序列相比相同碱基(或氨基酸)的百分数。此比对和%同源性或序列同一性可使用本领域中已知的软件程序进行确定,例如那些在Ausubel等人编辑,(2007)分子生物学实验手册(Current Protocols in Molecular Biology)中所阐述。优选地,使用缺省参数进行比对。一种比对程序是BLAST,使用缺省参数。具体来说,程序是BLASTN和BLASTP,利用

以下缺省参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两条链;截止=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50序列;分类依据=高分;数据库=非冗余,基因库+EMBL+DDBJ+PDB+基因库CDS翻译库+瑞士蛋白+SPupdate+PIR。这些程序的细节可在以下互联网地址中找到:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>,最后一次访问是在2007年11月26日。生物等效多核苷酸是那些具有特定%同源性并编码具有相同或类似生物活性的多肽的多核苷酸。

[0138] 术语“核酸的同系物”是指核苷酸序列与所述核酸或其补体的核苷酸序列具有某一同源性程度的核酸。双链核酸的同系物意欲包括具有与其补体有某一同源性程度的核苷酸序列的核酸。在一个方面中,核酸的同系物能够与核酸或其补体杂交。

[0139] “基因”是指含有至少一个开放读码框(ORF)在转录和翻译之后能够编码特定多肽或蛋白质的多核苷酸。本文所述的多核苷酸或多肽序列中的任一者可用于鉴别与其相关的基因的较大片段或全长编码序列。分离较大片段序列的方法已为所属领域的技术人员所知。

[0140] 术语“表达”是指基因产物的产生。

[0141] 如本文所用,“表达”是指将多核苷酸转录成mRNA的过程和/或将所转录mRNA随后翻译成肽、多肽、或蛋白质的过程。如果多核苷酸是源自基因组DNA,则表达可包括在真核细胞中拼接mRNA。

[0142] 术语“编码”当应用于多核苷酸时是指被描述为“编码”处于天然状态的多肽的多核苷酸,或当通过所属领域的技术人员已知的方法操纵时,其可经转录和/或翻译以产生用于所述多肽和/或其片段的mRNA。反义链是此核酸的补体,且编码序列可由其推断出。

[0143] “肽偶联物”是指通过一个或多个的多肽与另一化学或生物化合物共价键合或非共价键合来缔合。在非限制实例中,出于其期望目的,多肽与化学化合物的“偶联”导致多肽经改良的稳定性或效能。在一个实施例中,肽偶联至载体,其中所述载体是脂质体、胶束、或药学上可接受的聚合物。

[0144] “脂质体”是由同心脂质双层构成的微小囊泡。结构上,脂质体的大小和形状在长管到球体的范围内,其中尺寸从数百埃(Angstrom)到1毫米的几分之一。形成囊泡的脂质经选择以实现最终复合物的特定程度的流动性或刚性,来提供外层的脂质组合物。有天然(胆固醇)或双极性脂质且包括磷脂(例如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、和鞘磷脂(SM))和其它类型的双极性脂质,其包括但不限于二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE),其中烃链长度在14-22的范围内、且饱和或具有一个或多个的双C=C键。能够单独或与其它脂质组份组合产生稳定脂质体的脂质的实例是磷脂(例如氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂类、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰基磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺-甲基)环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)。可纳入脂质体中的额外的不含磷的脂质包括硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、肉豆蔻酸异丙酯、三乙醇胺-月桂基硫酸盐、烷基芳基硫酸盐、乙酰棕榈酸酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六烷基酯、两性丙烯酸聚合物、聚乙氧基化的脂肪酸酰胺、和以上提及的阳离子脂质(DDAB、DODAC、DMRIE、DMTAP、DOGS、DOTAP(DOTMA)、DOSPA、DPTAP、DSTAP、DC-Chol)。

带负电荷的脂质包括磷脂酸(PA)、二棕榈酰基磷脂酰基甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰基甘油和(DOPG)、双十六烷基磷酸盐,这些能够形成囊泡。通常,根据脂质体的总尺寸和层状结构的性质可将其分为三类。如由纽约科学院科学会议(New York Academy Sciences Meeting),“脂质体和其在生物学或医药中的用途(Liposomes and Their Use in Biology and Medicine)”1977年12月所阐述,这三类是多层囊泡(MLV)、小单层囊泡(SUV)和大单层囊泡(LUV)。

[0145] “胶束”是液体胶体中所分散的表面活性剂分子的聚集体。水溶液中的典型胶束与接触周围溶剂的亲水“头部”区形成聚集体,而掩蔽胶束中央的疏水尾部区。此类胶束称为正相胶束(水包油胶束)。反胶束具有在中央的头部基团以及向外延伸的尾部(油包水胶束)。胶束可用于附接多核苷酸、多肽、抗体或本文所述的组合物以促使有效递送至靶细胞或组织。

[0146] 词语“药学上可接受的聚合物”是指可偶联至一个或多个的本文所述多肽的化合物群组。预计聚合物偶联至多肽能够延长多肽在体内和体外的半寿期。非限制性实施例包括聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、纤维素衍生物、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、糖、多元醇和其混合物。

[0147] “基因递送运载体”定义为可将所插入多核苷酸运载至宿主细胞中的任何分子。基因递送运载体的实例是脂质体;胶束;生物相容聚合物,其包括天然聚合物和合成聚合物;脂蛋白;多肽;多糖;脂多糖;人工病毒包膜;金属粒子;和细菌、或病毒,例如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体和其它重组运载体,所述其它重组运载体在本领域中通常所用且已阐述用于在各种真核和原核宿主中的表达,且可用于基因疗法以及用于简单蛋白质表达。

[0148] 本发明的多核苷酸可使用基因递送运载体递送至细胞或组织中。如本文所用“基因递送”、“基因转移”、“转导”和诸如此类是指将外源性多核苷酸(有时称为“转基因”)引入宿主细胞中的术语,而不论用于引入的方法如何。所述方法包括各种已知技术,例如载体介导的基因转移(通过例如,病毒感染/转染、或各种其它基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物)以及有利于递送“裸”多核苷酸的各种技术(例如,电穿孔、“基因枪”递送和用于引入多核苷酸的各种其它技术)。所引入多核苷酸可稳定地或暂时地维持于宿主细胞中。稳定维持通常需要所引入多核苷酸含有与宿主细胞相容之复制起始点或整合于宿主细胞的复制子中,例如染色体外的复制子(例如,质粒)或核染色体或线粒体染色体。已知一些载体能够介导基因至哺乳动物细胞的转移,如本领域中已知和本文所阐述者。

[0149] “病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒颗粒,其包含欲在体内、离体或体外递送至宿主细胞的多核苷酸。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、甲病毒载体和诸如此类。也已研发甲病毒载体(例如基于西门利克森林病毒的载体(Semliki Forest virus-based vector)和基于辛德毕斯病毒的载体(Sindbis virus-based vector))用于基因疗法和免疫疗法。参见Schlesinger and Dubensky(1999)生物技术新见(Curr.Opin.Biotechnol.) 5:434-439和英(Ying)等人(1999)自然医学(Nat.Med.) 5(7):823-827。在基因转移是通过逆转录病毒载体介导的各方面中,载体构建体是指包含所述逆转录病毒基因组或其部分、和治疗基因的多核苷酸。如本文所用,“逆转录病毒介导的基因转移”或“逆转录病毒转导”具有相同含义且是指基因或核酸序列借助进入细胞的病毒

稳定地转移到宿主细胞中并将其基因组整合至宿主细胞基因组的过程。病毒可经由其正常感染机制进入宿主细胞或可经修饰以便其结合至不同的宿主细胞表面受体或配体以进入所述细胞。如本文所用,逆转录病毒载体是指能够通过病毒或类病毒进入机制将外源性核酸引入细胞中的病毒颗粒。

[0150] 逆转录病毒以RNA形式携带其遗传信息;然而,一旦病毒感染细胞,所述RNA将逆转录成DNA形式,DNA形式整合到所感染细胞的基因组DNA中。所整合DNA形式称为前病毒。

[0151] 在基因转移是由DNA病毒载体(例如腺病毒(Ad)或腺伴随病毒(AAV))介导的方面中,载体构建体是指包含所述病毒基因组或其部分、和转基因的多核苷酸。腺病毒(Ad)是相对充分表征的、同质病毒群组,其包括超过50个的血清型。参见例如,国际PCT申请案第W0 95/27071号。Ad不需要整合于宿主细胞基因组中。还构建了重组Ad源性载体、尤其那些重组和生成野生型病毒的可能性降低的载体。参见国际PCT申请案第W0 95/00655号和第W0 95/11984号。野生型AAV具有高感染性和整合于宿主细胞的基因组中的特异性。参见和Hermonat和Muzyczka (1984) 美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 81:6466-6470和Lebkowski等人(1988) 分子与细胞生物学(Mol.Cell.Biol.) 8:3988-3996。

[0152] 含有启动子和多核苷酸可操作地连接的克隆位点二者的载体已为本领域所知。所述载体能够在体外或体内转录RNA,且可自诸如斯绰基恩(Stratagene)(加利福尼亚州拉由拉市(La Jolla,CA))和普罗米加生物技术(Promega Biotech)(威斯康辛州麦迪逊(Madison,WI))等源购得。为优化表达和/或体外转录,可能需要去除、添加或改变克隆的5'和/或3'未翻译部分以消除额外的、潜在不适当的替代翻译起始密码子或可在转录或翻译层面上干扰或降低表达的其它序列。另一选择为,可将共有核糖体结合位点紧邻起始密码子的5'插入以增强表达。

[0153] 基因递送运载体还包括DNA/脂质体复合物、胶束和靶向病毒蛋白质-DNA复合物。还包含靶向抗体或其片段的脂质体可用于本发明方法中。为增强至细胞的递送,本发明的核酸或蛋白质可偶联至抗体或其结合细胞表面抗原(例如,在干细胞或心肌细胞上发现的细胞表面标志物)的结合片段。除将多核苷酸递送至细胞或细胞群以外,将本文所述蛋白质直接引入细胞或细胞群可通过蛋白质转染的非限制技术来实施,可增强表达和/或促进本发明蛋白质活性的替代培养条件是其它非限制技术。

[0154] 词语“固体支持物”是指诸如“培养板”、“基因芯片”或“微阵列”等非水性表面。所述基因芯片或微阵列可通过所属领域的技术人员已知的各种技术用于诊断和治疗目的。在一种技术中,将寡核苷酸排列于基因芯片上用于通过杂交途径测定DNA序列,例如美国专利第6,025,136号和第6,018,041号中所列举的。本发明的多核苷酸可修饰成探针,其进而可用于检测基因序列。所述技术已阐述于(例如)美国专利第5,968,740号和第5,858,659号中。探针也可附着至电极表面用于电化学检测核酸序列,如由Kayem等人在美国专利第5,952,172号和由Kelley等人在(1999) 核酸研究(Nucleic Acids Res.) 27:4830-4837中所阐述。

[0155] 各种“基因芯片”或“微阵列”和类似技术已为本领域所知。该等的实例包括(但不限于)实验室卡片(LabCard)(克拉拉生物科学公司(ACLARA Bio Sciences Inc.));基因芯片(GeneChip)(昂飞公司(Affymetric,Inc.));实验室芯片(LabChip)(开立普科技公司(Caliper Technologies Corp));具有电化学传感器的低密度阵列(临床微传感器

(ClinicalMicro Sensors));实验室碟片系统(LabCD System)(卡美拉生物科学公司(GameraBioscience Corp.));全能格栅(Omni Grid)(基因机器(Gene Machines));Q阵列(针提科斯公司(Genetix Ltd.));高通量自动质谱系统连同液相表达技术(基因踪迹系统公司(Gene Trace Systems, Inc.));热喷射点样系统(惠普公司(Hewlett PackardCompany));海森海芯片(Hyseq HyChip)(海森公司(Hyseq, Inc.));珠阵列(BeadArray)(依流纳公司(Illumina, Inc.));GEM(因赛特微阵列系统(Incyte Microarray Systems));可将12至64个斑点分配到多个载玻片上的高通量微阵列系统(智能生物仪器(IntelligentBio-Instruments));分子生物学工作站和纳芯片(Molecular Biology Workstation and NanoChip)(纳米基因公司(Nanogen, Inc.));微流体玻璃芯片(microfluidic glass chip)(奥瑞驰生物科学公司(Orchid biosciences, Inc.));具有4个PiezoTip压电随选尖端(piezoelectric drop-on-demand tip)的生物芯片阵列仪(BioChip Arrayer)(帕卡德仪器公司(Packard Instruments, Inc.));弗莱捷(FlexJet)(罗塞塔印谱迈瑞公司(Rosetta Inpharmatic, Inc.));MALDI-TOF质谱仪(西克诺(Sequenome));芯片标志(ChipMaker) 2和芯片标志3(特里克穆国际公司(TeleChem International, Inc.));和因感测器(GenoSensor)(威斯尔斯公司(Vysis, Inc.)),如在赫勒(Heller)(2002)生物医学工程年评(Annu. Rev. Biomed. Eng.) 4:129-153中所确定和阐述者。“基因芯片”或“微阵列”的实例还阐述于美国专利公开案第2007-0111322号、第2007-0099198号、第2007-0084997号、第2007-0059769号和第2007-0059765号和美国专利第7,138,506号、第7,070,740号和第6,989,267号中。

[0156] 在一个方面中,制备含有与本文所述多核苷酸、多肽或抗体同源的探针或引物的“基因芯片”或“微阵列”。从患者获得适宜样品,实施基因组DNA、RNA、蛋白质或其任一组合的提取并视需要扩增。使样品在适于所关注基因或基因产物杂交至基因芯片或微阵列所含探针或引物的条件下接触所述基因芯片或微阵列面板。探针或引物可以可检测方式标记,由此鉴别所关注基因。另一选择为,可添加化学或生物反应以鉴别与所关注基因的DNA或RNA杂交的探针或引物。然后,借助以上提及的装置和方法测定患者的基因型或表型。

[0157] 固相支持物的其它非限制实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和经修饰纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩、和磁铁矿。支持物的性质具有一定程度的可溶性或不溶。支持物质实际上可具有任何可能结构构造,只要偶合分子能够结合多核苷酸、多肽或抗体即可。因此,支持物构造可为球形(如呈珠粒形式)或圆柱形(如呈测试管的内部表面或棒的外部表面)。另一选择为,表面可平坦,例如薄片、测试条等,或另一选择为聚苯乙烯珠粒。所属领域的技术人员应知道用于结合抗体或抗原的许多其它适宜支持物将能够通过使用常规实验确定同样的事情。

[0158] “真核细胞”包含除原核生物界(monera)以外的所有生物界(life kingdom)。其可容易地通过膜结合细胞核辨别。动物、植物、真菌和原生生物是真核生物或有机体,其细胞通过内部膜和细胞骨架组织成复合结构。最具特征的膜结合结构是细胞核。真核宿主包括(例如)酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞,或另一选择为来自原核细胞,如上所述。非限制性实例包括猿、牛、猪、鼠科动物、大鼠、鸟类、爬行动物和人类。

[0159] “原核细胞”通常缺少细胞核或任何其它膜结合细胞器且分成两个领域,即细菌和古细菌。另外,这些细胞的遗传信息不具有染色体DNA,而是在称为质粒的圆形环中。细菌细

胞极小,大致为动物线粒体的大小(直径约1-2 μm 且长为10 μm)。原核细胞以以下三种主要形状为特征:棒形、球形和螺旋形。细菌细胞并不像真核生物那样实施精心复制过程,其通过二分分裂来分裂。实例包括(但不限于)芽孢杆菌(bacillus)细菌、大肠杆菌(E.coli)细菌和沙门氏菌属(Salmonella)细菌。

[0160] 本文所用的术语“人类抗体”意欲包括具有源自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人类抗体可包括不是由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,本文所用的术语“人类抗体”不欲包括其中源自另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已移植到人类框架序列上的抗体。因此,本文所用术语“人类抗体”是指其中实质上蛋白质的每一部分(例如,CDR、框架、 C_L 、 C_H 结构域(例如, $\text{C}_{\text{H}1}$ 、 $\text{C}_{\text{H}2}$ 、 $\text{C}_{\text{H}3}$)、铰链、(VL、VH))实质上在人类中无免疫原性的抗体,其中仅有较小的序列变化或改变。同样,指定灵长目动物(猴子、狒狒、黑猩猩等)、啮齿类动物(小鼠、大鼠、家兔、天竺鼠、仓鼠和诸如此类)和其它哺乳动物的抗体指定所述种、亚属、属、亚科、科特异性抗体。此外,嵌合抗体包括以上抗体的任意组合。所述改变或变化相对于未经修饰的抗体任选且优选地保留或降低在人类或其它物种中的免疫原性。因此,人类抗体不同于嵌合或人源化抗体。应指出,人类抗体可由能够表达功能性重排的人类免疫球蛋白(例如,重链和/或轻链)基因的非人类动物或原核或真核细胞产生。此外,当人类抗体是单链抗体时,其可包含在天然人类抗体中未发现的接头肽。例如,Fv可包含连接重链的可变区和轻链的可变区的接头肽,例如2至约8个甘氨酸或其它氨基酸残基。所述接头肽视为是人类来源的。

[0161] 如本文所用,如果人类抗体是使用人类免疫球蛋白序列(例如)通过对携带人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫或通过筛选人类免疫球蛋白基因文库自一个系统获得,则所述抗体是“源自”特定种系序列。“源自”人类种系免疫球蛋白序列的人类抗体可例如通过将人类抗体的氨基酸序列与人类种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较来鉴别。所选人类抗体通常与人类种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%的氨基酸序列同一性,且含有当与其它物种(例如,鼠科动物种系序列)的种系免疫球蛋白氨基酸序列相比时将人类抗体鉴别为人类的氨基酸残基。在某些情况下,人类抗体与所述种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性。通常,源自特定人类种系序列的人类抗体通常将展示与由人类种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过10个氨基酸的差异。在某些情况下,人类抗体可展示与由所述种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过5、或甚至不超过4、3、2、或1个氨基酸的差异。

[0162] “人类单克隆抗体”是指具有源自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的显示单一结合特异性的抗体。该术语还意指重组人类抗体。用以制备这些抗体的方法阐述于本文中。

[0163] 本文所用术语“重组人类抗体”包括重组方式制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,例如从使用人类免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或自所述动物制备的杂交瘤分离的抗体、经转化以表达所述抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)分离的抗体、从重组、组合人类抗体文库分离的抗体、和通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列拼接到其它DNA序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。所述重组人类抗体具有源

自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,所述重组人类抗体可经受体外诱变(或者,当使用人类Ig序列转基因的动物时,经受体内体细胞诱变),且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列尽管源自人类种系VH和VL序列并与其相关,但其为在体内可能不天然存在于人类抗体种系谱中的序列。用以制备这些抗体的方法阐述于本文中。

[0164] 如本文所用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类型(例如,IgM或IgG1)。

[0165] 本文所用的术语“多克隆抗体”或“多克隆抗体组合物”是指源自不同B细胞系的抗体的制剂。这些是经分泌对抗特定抗原的免疫球蛋白分子的混合物,每一者识别一种不同表位。

[0166] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有单一分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物对于特定表位展示单一结合特异性和亲和力。

[0167] 本文所用术语“标记”意欲指可直接或间接检测的化合物或组合物,其直接或间接偶联至欲检测组合物(例如,多核苷酸或蛋白质,例如抗体)以生成“经标记”组合物。所述术语还包括偶联至当表达所插入序列时将提供信号的多核苷酸(例如绿色荧光蛋白(GFP)和诸如此类)的序列。所述标记本身为可检测(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶标记情况下能催化可检测底物化合物或组合物的化学变化。所述标记可适用于小规模检测或更适用于高通量筛选。因此,适宜标记包括(但不限于)放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料、和蛋白质(包括酶)。标记可简单的检测或其可经量化。简单检测的反应通常包含仅仅证实其存在的反应,而经量化的反应通常包含具有可量化(例如,数值上可报告的)值(例如强度、极性和/或其它性质)的反应。在发光或荧光分析中,可检测反应可直接使用与实际参与结合的分析组份缔合的发光基团或荧光基团、或间接地使用与另一(例如,报道分子或指示剂)组份缔合的发光基团或荧光基团来生成。

[0168] 产生信号的发光标记的实例包括(但不限于)生物发光和化学发光。可检测发光反应通常包含发光信号的改变或出现。用于发光标记分析组份的适宜方法和发光基团已为本领域所知且阐述于(例如)Haugland,Richard P. (1996) 荧光探针和研究化学品手册(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals) (第6版)中。荧光探针的实例包括(但不限于)水母荧光素和萤光素酶。

[0169] 适宜荧光标记的实例包括(但不限于)萤光素、若丹明(rhodamine)、四甲基若丹明、曙红(eosin)、赤藓红(erythrosin)、香豆素(coumarin)、甲基香豆素、茈、孔雀绿(Malachite green)、均二苯乙烯、萤光黄(Lucifer Yellow)、瀑布蓝(Cascade BlueTM)、和德克萨斯红(Texas Red)。其它适宜光学染料阐述于Haugland,Richard P. (1996) 荧光探针和研究化学品手册(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals) (第6版)中。

[0170] 在另一方面中,荧光标记经官能化以促使共价附接至细胞或组织中或其表面上存在的细胞组份(例如细胞表面标志物)。适宜官能团包括(但不限于)异硫氰酸酯基团、氨基、卤代乙酰基、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺酯和磺酰卤化物,所有这些都可用于将荧光标记附接至第二分子。荧光标记的官能团的选择将取决于至接头、试剂、标志物或第二标记试剂的附接位点。

[0171] III. 单位剂量制剂和其使用方法

[0172] 本发明的一个方面提供一种单位剂量制剂,其包含药学上可接受的载体和包含氨基酸序列SEQ ID NO.13(r-解毒剂)或与SEQ ID NO.13具有至少80%同源性的多肽的双链多肽,其量为约10mg-约2g。本发明是基于惊人的发现一定剂量的r-解毒剂能够在大鼠和猴体内中和各种因子Xa抑制剂,例如贝曲西班、利伐沙班、低分子量肝素、依诺肝素和阿哌沙班。然后使用模型外推该数据获得了用于人类的能够中和抑制剂的剂量(如下述的实施例25和26解释的)。

[0173] 在某些方面,制剂是以约10mg-约2g的量施用的。本发明预计的其他量包括约100mg-约1.5g、约200mg-约1g、和约400mg-约900mg。

[0174] 在另一实施例中,所述单位剂量制剂是以中和量施用的,其是在至少约30分钟内,使多肽的循环浓度对因子Xa抑制剂的循环浓度的摩尔比为至少约1:1倍。在其他实施例中所述摩尔比是约1:1或约2:1或约4:1。

[0175] 施用的制剂以至少约20%、或以至少约50%、或以至少约75%、或以至少约90%、或以至少约95%中和因子Xa抑制剂。

[0176] “药学上可接受的载体”是指可用于本发明组合物中的任何稀释剂、赋形剂或载体。药学上可接受的载体包括盐水、离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐)、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物、聚乙二醇和羊毛脂。适宜医药载体阐述于雷明顿的医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),麦克出版公司(Mack Publishing Company),此领域的一本标准参考文本。其优选地针对所打算施用的形式(即,口服片剂、胶囊、酏剂、糖浆和诸如此类)、并与传统医药实践一致来选择。

[0177] 在一个实施例中,所述制剂包含盐水并且解毒剂以每毫升盐水约0.2-约10mg多肽的浓度存在。在另一实施例中,浓度是每毫升盐水约2-约6mg多肽。在再另一实施例中,浓度是每毫升盐水约2mg多肽。

[0178] 本发明的制剂可通过本领域已知的方法来制造,尤其如传统的造粒、混合、溶解、囊封、冻干或乳化过程。组合物可制成各种形式,其包括颗粒、沉淀、或粒子、粉末(包括冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥的粉末、无定形粉末)、注射液、乳液、酏剂、悬浮液或溶液。制剂可任选地含有稳定剂、pH调节剂、表面活性剂、生物可用性改性剂和这些的组合。

[0179] 在一个实施例中,所述解毒剂是冻干的。冻干多肽的方法是本领域已知的。

[0180] 医药制剂还可使用无菌液体(例如油、水、醇和它们的组合)制成液体悬浮液或溶液。可添加医药上适宜的表面活性剂、悬浮剂或乳化剂用于经口或胃肠外施用。悬浮液可包括油,例如花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油和橄榄油。悬浮液制剂还可含有脂肪酸的酯,例如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、脂肪酸甘油酯和乙酰化脂肪酸甘油酯。悬浮液制剂可包括醇,例如乙醇、异丙醇、十六醇、甘油和丙二醇。悬浮液制剂中也可使用醚(例如聚(乙二醇))、石油烃(例如矿物油和石油)和水。

[0181] 本发明拟使用的一种制剂是以针对商业可获得的人凝血因子VIIa(rFVIIa)的制剂为前提的。这一制剂采用冻干的多肽并包含以下附加成分:

[0182]

内含物	1.2mg瓶	4.8mg瓶
多肽(解毒剂)	1200mg	4800mg
氯化钠	6mg	23mg
二水氯化钙	3mg	12mg
甘氨酸甘氨酸	3mg	11mg
聚山梨酯80	0.2mg	0.6mg
甘露醇	60mg	240mg

[0183] 在一个方面中,本发明涉及一种在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中,选择性结合和抑制外源施用的因子Xa抑制剂的方法,包括向所述受试者施用本发明的单位剂量制剂。

[0184] 在另一个方面中,本发明涉及一种在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中,防止、减少或停止出血的方法,包括向所述受试者施用本发明的单位剂量制剂。

[0185] 在再另一方面中,本发明涉及一种在正经历使用因子Xa抑制剂的抗凝血疗法的受试者中,校正fXa抑制剂依赖性药效或替代标志物的方法,包括向所述受试者施用本发明的单位剂量制剂。所述药效或替代标志物可选自下组:INR、PT、aPTT、ACT、抗fXa单位、和凝血酶生成(Technothrombin TGA、凝血弹性描记法(thromboelastography)、自动校正凝血酶曲线法(calibrated automated thrombogram,CAT))。

[0186] 所述制剂用于施用给哺乳动物,优选人类。本发明所述制剂可以各种方式、优选地胃肠外施用。

[0187] 为了在紧急情况中迅速逆转患者血浆中所存在fXa抑制剂的抗凝血活性,预计本发明的解毒剂可以或可能通过胃肠外施用方式施用至体循环。本文所用术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内、和颅内注射或输注技术。然而,在所中和的fXa抑制剂具有长血浆半寿期的情况下,可能需要连续输注或持续释放制剂以结合至fXa抑制剂且由此在fXa抑制剂自身体清除之前释放出活性fXa。因此,在一个方面中,所述制剂作为推注向患者施用。在另一个方面中,所述制剂通过输注施用。在另一个方面中,所述制剂通过推注和输注的组合施用。

[0188] 施用制剂直至出血已基本上停止。预计输注可以施用约6小时、或约6-约12小时、或约12-约24小时或48小时。

[0189] 在一些实施例中,约10%-约20%的全部剂量和其余将输注以上提到的时间。

[0190] 本发明组合物的无菌可注射形式可为水性或油性悬浮液。这些悬浮液可根据业内已知技术使用适宜分散剂或润湿剂和悬浮剂来调配。无菌可注射制剂也可存于无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如,作为于1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受运载体和溶剂包括水、林格氏(Ringer)溶液和等渗氯化钠溶液。此外,通常采用无菌不挥发油作为溶剂或悬浮介质。出于此目的,可采用任一温和不挥发油,包括合成的单-或二-甘油酯。脂肪酸(例如油酸和其甘油酯衍生物)可用于可注射制剂,例如天然的药学上可接受的油类,例如橄榄油或蓖麻油,其尤其呈其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或类似分散剂,其通常用于调配包括乳液和悬浮液在内的药学上可接受的剂型。也可将其它通常使用的表面活性剂用

于调配目的,例如吐温(Tween)、司盘(Spans)和其它通常用于制造药学上可接受的固体、液体、或其它剂型的乳化剂或生物利用度增强剂。化合物可经调配用于通过注射(例如,推注或连续输注)胃肠外施用。用于注射的单位剂型可在安瓿或多剂量容器中。

[0191] 除以上所述剂型以外,药学上可接受的赋形剂和载体和剂量形式通常已为所属领域的技术人员熟知且包括在本发明内。应理解,针对任一特定患者的具体剂量和治疗方案应根据多种因素而定,这些因素包括:所采用具体解毒剂的活性、患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食、肾和肝功能、和施用时间、排泄速度、药物组合、治疗医师或兽医的判断和所治疗特定疾病的严重性。

[0192] IV. 解毒剂

[0193] 拟用于本发明的制剂和方法的额外的解毒剂如下所示。

[0194] 因子Xa衍生物

[0195] 本发明的一个方面是fXa衍生物(例如Gla-结构域缺陷的fXa或去Gla的fXa)作为安全且有效解毒剂以实质上中和凝血fXa的抑制剂的活性以防止或停止出血的用途。预计本发明的解毒剂将用于逆转fXa抑制剂、尤其活性位点定向小分子抑制剂的抗凝血作用。

[0196] 预计fXa抑制剂的解毒剂具有降低的促凝血活性或没有促凝血活性但能够与fXa抑制剂结合。预计所述有限活性允许以高于循环野生型fXa的水平给药所述解毒剂。某些fXa衍生物(例如去Gla的fXa和Gla缺陷的fXa)是本发明的适宜解毒剂。除具有降低的或消除的促凝血活性以外,本发明的解毒剂还应对患者实质上无免疫原性。解毒剂可含有两个或两个以上的突变和/或修饰的组合。此外,任一上述fXa衍生物可单独施用或彼此组合施用。

[0197] 因子Xa是血液凝血途径中使凝血酶原转化成凝血酶的丝氨酸蛋白酶。其从非活性因子X当通过固有Xase(由因子IXa与其辅因子(即因子VIIIa)形成的复合物)或非固有Xase(由因子VIIa与其辅因子(即组织因子)形成的复合物)活化时产生。经活化fX(fXa)可在其重链的C-末端进一步进行自催化切割,将fXa α 转化成亚形式fXa β (Jesty, J等人生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 1975, 250(12):4497-4504)。fXa α 和fXa β 二者均是本发明的适宜物质。fXa自身以不足以帮助凝血的低速率转化凝血酶原。一旦fXa与辅因子Ca²⁺、磷脂和因子Va形成凝血酶原酶复合物,其即可以快到足以帮助凝血的速率活化凝血酶原(Skogen, W.F.等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 1984, 259(4):2306-10)。复合物需要带负电荷的磷脂与fXa的Gla结构域中的 γ -羧基谷氨酸残基经由Ca²⁺桥连结合。

[0198] 因此,尽管Gla结构域不含fXa的活性位点,但其使fXa能够通过 γ -羧基谷氨酸残基形成凝血酶原酶复合物。此可由通过胰凝乳蛋白酶消化选择性去除fXa Gla-结构域来证实(参见图7和实施例1)。凝血分析是在通过胰凝乳蛋白酶消化切割Gla结构域的过程期间针对fXa来实施。已报告(Skogen 等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 1984, 259(4):2306-10),由无Gla结构域的fXa、fVa、磷脂和钙离子组成的重构凝血酶原酶复合物以显著降低的速率产生凝血酶(与含天然fXa的对照复合物相比,生成0.5%产物)。如图7中所示,fXa在血凝块形成中的活性在所述fXa被胰凝乳蛋白酶消化15分钟之后部分地降低且在消化30分钟之后活性完全丧失。因此,已发现缺少钙离子依赖性膜结合所需的适宜 γ -羧基谷氨酸残基的羧化不全或脱羧fXa不能够进行膜依赖性凝血复合物组装且不帮助凝血(Mann, KG等人,血液(Blood), 1990, 76:1-16)。

[0199] 还已经建立, Gla-结构域缺陷的fXa能够结合fXa的活性位点定向抑制剂。(Brandstetter, H等人, 生物化学杂志(J. Bio. Chem.), 1996, 271:29988-29992)。已报告结合至去Gla的人类fXa的小分子fXa抑制剂的结晶学, 其提供活性位点裂缝的结构描述(Brandstetter, 生物化学杂志(J. Bio. Chem.), 1996, 271:29988-29992和Roehrig, 医药化学杂志(J. Med. Chem.), 2005, 48 (19):5900-8)。图8展示, 去Gla的无水-fXa与fXa抑制剂贝曲西班牙展示结合亲和力为0.319nM, 与天然fXa的相当。

[0200] 现在还发现, 去Gla的fXa和具有降低的促凝血活性但能够结合fXa抑制剂的其它fXa衍生物可用作fXa抑制剂的解毒剂。如图9中所示, 去Gla的无水-fXa展示在680nM的浓度下完全逆转贝曲西班牙的抗凝血活性。如实施例2中所详细阐述, 凝血酶生成是通过添加含TF的试剂(因奴韦恩(Innovin))来起始且因此表明凝血因子在外因性凝血途径中的功能。在实施例9-13中还证明, 重组解毒剂可用于逆转广泛多样的抗凝血剂。

[0201] 利用活化的部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)试剂(阿克停(Actin)FS)实施的凝血延长分析来测定凝血因子在内因性凝血途径中的作用, 其也表明去Gla的无水-fXa具有解毒活性。图10展示去Gla的无水-fXa对250nM贝曲西班牙的剂量响应解毒作用, 其中在600nM完全逆转。图11展示去Gla的无水-fXa还能够逆转另一种fXa抑制剂依诺肝素的抗凝血活性。图12展示去Gla的无水-fXa并未对直接凝血酶抑制剂阿加曲班展示显明解毒活性。因此, 去Gla的无水-fXa是fXa抑制剂的选择性解毒剂且能够恢复由外因性或内因性途径引发的fXa促凝血活性。

[0202] 此外, 去Gla的无水-fXa的解毒活性是通过利用传统凝血计时器所测量的aPTT延长分析来证明。如图13中所示, 去Gla的无水-fXa自身在所测试最高浓度(2576nM)下对对照血浆的aPTT没有作用。400nM的贝曲西班牙使aPTT延长超过2倍。贝曲西班牙的此抗凝血作用是通过去Gla的无水-fXa以剂量响应方式来逆转, 其中在解毒剂浓度高于1610nM时aPTT恢复至接近对照血浆的正常水平。

[0203] 预计进一步在fXa轻链处截断(例如, 额外缺失EGF1结构域、EGF1加EGF2结构域、或其片段)且仅具有重链的无活性fXa可为本发明有用的解毒剂。

[0204] Gla-结构域缺陷的fXa在生理相关浓度下并不帮助凝血。然而, 蛋白质在较高浓度下具有裂解许多底物并造成凝血的能力。例如, Skogen等人(Skogen, W.F.等人, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 1984, 259 (4):2306-10)展示牛的去Gla的fXa相对于野生型fXa具有约0.5-1.0%的凝血酶原酶复合物活性。因此, 进一步降低或完全消除fXa衍生物的促凝血活性的修饰是本发明方法所预期的。所述修饰可在(例如)fXa的催化结构域中。

[0205] 预计修饰fXa重链中的催化结构域以降低其促凝血活性的若干种途径。例如, fXa的活性位点残基S379(如SEQ ID No. 7中所示)可通过由脱氢丙氨酸(参见实施例1)或丙氨酸(参见实施例6)选择性替代来降低或消除促凝血活性。还知道, fXa与靶向fXa的外部位点的试剂之间形成复合物可阻断fXa的大分子结合能力, 由此降低其促凝血活性同时保留活性位点的小分子结合能力。此外部位点靶向试剂包括(但不限于)靶向自活性位点去除的区的单克隆抗体(Wilkens, M和Krishnaswamy, S., 生物化学杂志(J. Bio. Chem.), 2002, 277 (11), 9366-9374)、或 α -2-巨球蛋白。已知 α -2-巨球蛋白-丝氨酸蛋白酶复合物(例如与胰蛋白酶、凝血酶或fXa复合)能够结合小分子底物(Kurolwa, K.等人, 临床化学(Clin. Chem.) 1989, 35 (11), 2169-2172)。

[0206] 还知道,仅在重链中具有修饰而其轻链保持未变的无活性fXa由于其干扰正常fXa的促凝血活性将作为凝血酶原酶的抑制剂(Hollenbach, S. 等人, 血栓形成和止血(Thromb. Haemost.), 1994, 71 (3), 357-62), 如图6中所示。因此, 在一个实施例中, fXa衍生物在轻链和重链二者中都具有修饰。已发现, 这些修饰降低或消除促凝血活性和抗凝血活性二者, 同时保留fXa衍生物的抑制剂结合能力。

[0207] 有若干方法可用于产生本文所述的Gla-结构域缺陷的fXa衍生物或其它fXa衍生物。例如, Gla-结构域可通过胰凝乳蛋白酶切割完全去除, 产生无Gla结构域的fXa。另一选择为, 无Gla-结构域的fX可通过胰凝乳蛋白酶切割天然fX来产生。然后, 无Gla结构域的fX可通过fX活化剂转化成无Gla结构域的fXa。fX可自与欲治疗患者相同或不同的物种的血浆中分离。例如, 牛的fX已展示在人类血浆分析中起作用。fX活化剂的实例包括(但不限于)蛇毒(例如Russell的蝰蛇毒)、和fVIIa/组织因子或fIXa/fVIIIa的复合物。所述方法已为所属领域的技术人员所熟知。例如, Rudolph A.E. 等人已报告从Arg347由谷氨酰胺单取代的重组因子X (fX) (fXR347N) 产生的重组fXa (生物化学 (Biochem.) 2000, 39 (11): 2861-2867)。在一个实施例中, 从非人类来源产生的fXa衍生物是非免疫原性或实质上为非免疫原性。实施例7还提供产生具有氨基酸序列SEQ ID NO. 12的重组解毒剂的方法。

[0208] 所述fXa衍生物也可从人类血浆纯化, 或可通过重组DNA方法产生, 其中将fXa衍生物的适当基因表达于适宜宿主有机体中。重组fXa的表达和纯化已由许多群体报告, 参见例如, Larson, P.J. 等人, 生物化学 (Biochem.), 1998, 37: 5029-5038和Camire, R.M. 等人, 生物化学 (Biochem.), 2000, 39, 14322-14329用于产生重组fX; Wolf, D.L. 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1991, 266 (21): 13726-13730用于产生重组fXa。经修饰的fXa可根据这些程序使用具有编码期望fXa突变体的核苷酸序列的遗传修饰的cDNA来制备。实施例6给出具有作为解毒剂的功能活性的无Gla结构域的fXa-S379突变体的直接表达的更详细阐述。

[0209] 预计Gla-结构域缺陷的活性位点经突变或经修饰的fXa (例如羧化不全fXa) 也可用作fXa抑制剂解毒剂。羧化不全的fXa可通过重组方式通过在蛋白质表达期间抑制维生素K衍生物(维生素K衍生物是翻译后修饰以形成Gla残基所需的) 或通过在组织培养过程中添加维生素K拮抗剂(例如华法林) 来制备。脱羧fXa可通过加热(Bajaj P., 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1982, 257 (7): 3726-3731) 或通过胰凝乳蛋白酶的蛋白水解消化(Morita T. 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1986, 261 (9): 4015-4023) 来制备。解毒剂也可在原核系统中产生, 随后在体外再折叠或构造fXa抑制剂结合位点。

[0210] 所述Gla残基也可以化学方式经修饰以去除造成钙离子依赖性膜结合的羧基。例如, Gla残基上的羧基可在脱羧条件下选择性去除或可通过(例如) 酯化或胺化加帽(capping)。期望所述酯化或胺化能抵抗体内水解以便所述经修饰的fXa不易于转化成可造成血栓形成的活性fXa。

[0211] fXa的其它突变体或衍生物也可是本发明的有用解毒剂。在一个实施例中, 本发明涵盖彼得(Peter J.)、拉森(Larson) 等人, 生物化学 (Biochem.), 1998, 37: 5029-5038中所阐述的突变体作为fXa抑制剂解毒剂的用途。

[0212] 在另一实施例中, 本发明涵盖催化上非活性fXa突变体用于制备fXa抑制剂解毒剂的用途。例如, 阐述于辛哈(Sinha, U.) 等人, 蛋白质表达和纯化 (Protein Expression and Purif.), 1992, 3: 518-524中的突变体rXai、具有化学修饰的突变体(例如脱氢丙氨酸

(无水fXa)),如野上(Nogami)等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.)1999,274(43):31000-7中所阐述者。活性位点丝氨酸(fX编号中的Ser379,如SEQ ID NO.7中所示,和胰凝乳蛋白酶编号中的Ser 195)由丙氨酸(fX编号中的fXa-S379A,或胰凝乳蛋白酶编号中的fXa-S195A)替代的FXa(其中促凝血活性被消除)也可用作fXa抑制剂的解毒剂。本发明还设想活性位点丝氨酸残基不可逆地酰化但仍能够结合小分子抑制剂的fXa衍生物。活性位点丝氨酸可逆地酰化的FXa已由沃尔夫(Wolf)等人,血液(Blood),1995,86(11):4153-7报告。然而,所述可逆的酰化能够时间依赖性的产生活性fXa且可导致活性fXa在一段时期内过量。去酰化速率可通过类似于那些在林(Lin P. H.)等人,血栓研究(Thrombosis Res),1997,88(4),365-372中所阐述的方法来降低。例如,Ser379(胰凝乳蛋白酶编号中的Ser195)由4-甲氧基苄基和3-溴-4-甲氧基苄基酰化的fXa分子当在pH7.5的缓冲液中于37℃下培养4小时时,其恢复初始活性的小于50%。

[0213] 一个实施例涉及在已知对fXa与辅因子fV/fVa的相互作用很重要的fXa残基处突变的fXa衍生物的用途。所述残基包括(但不限于)Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、或Lys414(SEQ ID NO.3和7,这些氨基酸对应于胰凝乳蛋白酶编号中的Arg125、Glu129、Arg165、Lys169、Lys230)。所述突变体的实例已报告于鲁道夫(Rudolph, A.E.)等人,生物化学杂志(J.Bio.Chem.),2001,276:5123-5128中。此外,已知对fVIII/fVIIIa相互作用很重要的fXa残基(例如SEQ ID NO.3和7中的Arg424(胰凝乳蛋白酶编号中的Arg240)处的突变也可用作fXa抑制剂解毒剂。所述突变体的实例阐述于野上(Nogami, K.)等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),2004,279(32):33104-33113中。

[0214] fXa的活性位点残基或已知对于丝氨酸蛋白酶相互作用重要的残基的其它修饰也可产生本发明的有用的解毒剂,例如,SEQ ID NO.3和7中的Glu216、Glu218、和Arg332(分别为胰凝乳蛋白酶编号中的Glu37、Glu39、和Arg 150)由其它氨基酸残基替代。

[0215] 在一个实施例中,如通过酰胺分解底物切割分析所评价,解毒剂的残余促凝血活性为人类血浆源性天然fXa的<1%、优选地<0.1%、更优选地<0.05%。例如,对于重组fXa-S379A当活性位点Ser379(胰凝乳蛋白酶编号中的S195)由丙氨酸残基替代时有不可测量的促凝血活性,如通过凝血分析所测量。

[0216] 本发明进一步涉及编码上述fXa衍生物的核酸序列、具体来说DNA序列。这些序列可容易地通过根据遗传密码将多肽序列翻译回相应的DNA序列来确定。所用密码子优选为那些在所需宿主有机体中产生良好表达者。核酸序列可自天然fXa基因序列开始通过位点特异性诱变或者通过完整DNA合成来制备。

[0217] 本发明的多肽

[0218] 在某些方面中,本发明涉及包含氨基酸序列SEQ ID NO.13或15的经分离多肽。本发明还涵盖与SEQ ID NO.13或15具有至少80%同源性的多肽。

[0219] 包含本发明氨基酸序列的多肽可通过在适当宿主细胞中表达编码本发明多肽序列的多核苷酸来制备。此可通过所属领域的技术人员已知的重组DNA技术的方法来完成。因此,本发明还提供在真核或原核宿主细胞中以重组方式产生本发明多肽的方法。本发明的蛋白质和多肽还可通过化学合成使用市售自动肽合成器(例如由珀金埃尔默/应用生物系统公司(Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc.)制造,430A或431A型,美国加利福尼亚州福斯特城(Foster City, CA, USA))来获得。所合成蛋白质或多肽可经沉淀并(例如)通过

高效液相层析 (HPLC) 进一步纯化。因此, 本发明还提供以化学方式合成本发明蛋白质的方法, 其通过提供蛋白质的序列和试剂 (例如氨基酸和酶) 并将氨基酸以适当定向与线性序列连接在一起实施。

[0220] 所属领域的技术人员已熟知, 可对任何肽实施修饰以提供经改变的性质。本发明的多肽可经修饰以包括非天然氨基酸。因此, 肽可包含D-氨基酸、D-和L-氨基酸的组合、和各种“设计者”氨基酸 (例如, β -甲基氨基酸、C- α -甲基氨基酸和N- α -甲基氨基酸等) 以将特定性质传递给肽。此外, 通过在特定偶合步骤中分配特定氨基酸, 可生成具有 α -螺旋、 β 转角、 β 片层、 α -转角的肽和环状肽。通常, 据信 α -螺旋二级结构或随机二级结构是优选的。

[0221] 在另一实施例中, 将选择赋予有用化学和结构性质的多肽亚单位。例如, 包含D-氨基酸的肽可对抗体内的L-氨基酸特异性蛋白酶。利用D-氨基酸修饰的化合物也可利用以相反顺序排列的氨基酸来合成以作为逆反肽 (retro-inverso peptide) 产生本发明的肽。此外, 本发明设想制备具有较好的经定义结构性质的肽、和肽模拟物、和肽模拟键 (例如酯键) 用以制备具有新颖性质的肽的用途。在另一实施例中, 可生成纳入经还原肽键 (即, $R_1-CH_2NH-R_2$, 其中 R_1 和 R_2 为氨基酸残基或序列) 的肽。经还原肽键可作为二肽亚单位引入。这种分子将抵抗肽键水解, 例如, 蛋白酶活性。所述分子将提供具有独特功能和活性的配体, 例如由于抵抗代谢分解或蛋白酶活性而延长的体内半寿期。此外, 已知在某些系统中限制性肽 (constrained peptide) 展示增强的功能活性 (赫鲁比 (Hruby) (1982) 生命科学 (Life Sciences) 31:189-199 和赫鲁比 (Hruby) 等人 (1990) 生物化学杂志 (Biochem J.) 268:249-262); 本发明提供用以产生在所有其它位置处纳入随机序列的限制性肽的方法。

[0222] 以下非典型氨基酸可纳入本发明的肽中以引入特定构象基序: 1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸酯 (卡则内斯科 (Kaznierski) 等人 (1991) 美国化学会会志 (J. Am. Chem. Soc.) 113:2275-2283); (2S,3S)-甲基-苯丙氨酸、(2S,3R)-甲基-苯丙氨酸、(2R,3S)-甲基-苯丙氨酸和 (2R,3R)-甲基-苯丙氨酸 (卡则内斯科 (Kazmierski) 和赫鲁比 (Hruby) (1991) 四面体通讯 (Tetrahedron Lett.) 32(41):5769-5772); 2-氨基四氢萘-2-羧酸 (兰迪斯 (Landis) (1989) 博士论文 (Ph.D. Thesis), 亚利桑那大学 (University of Arizona)); 羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸酯 (马亚科 (Miyake) 等人 (1989) 武田研究实验室杂志 (J. Takeda Res. Labs.) 43:53-76) 组氨酸异喹啉羧酸 (泽赫尔 (Zechel) 等人 (1991) 国际肽和蛋白质研究杂志 (Int. J. Pep. Protein Res.) 38(2):131-138); 和HIC (组氨酸环脲) (达拉尼帕噶达 (Dharanipragada) 等人 (1993) 国际肽和蛋白质研究杂志 (Int. J. Pep. Protein Res.) 42(1):68-77) 和 (达拉尼帕噶达 (Dharanipragada) 等人 (1992) 结晶学报, C辑 (Acta. Crystallogr. C.) 48:1239-1241)。

[0223] 以下氨基酸类似物和肽模拟物可纳入肽中以诱导或赋予特定二级结构: LL-Acp (LL-3-氨基-2-丙酮-6-羧酸) (LL-3-amino-2-propenidone-6-carboxylic acid); β -转角诱导二肽类似物 (肯普 (Kemp) 等人 (1985) 有机化学杂志 (J. Org. Chem.) 50:5834-5838); β -片层诱导类似物 (肯普 (Kemp) 等人 (1988) 四面体通讯 (Tetrahedron Lett.) 29:5081-5082); β -转角诱导类似物 (肯普 (Kemp) 等人 (1988) 四面体通讯 (Tetrahedron Lett.) 29:5057-5060); α -螺旋诱导类似物 (肯普 (Kemp) 等人 (1988) 四面体通讯 (Tetrahedron Lett.) 29:4935-4938); α -转角诱导类似物 (肯普 (Kemp) 等人 (1989) 有机化学杂志 (J. Org. Chem.) 54:109:115); 由以下参考文献提供的类似物: 永井 (Nagai) 和佐藤 (Sato) (1985) 四面体通

讯 (Tetrahedron Lett.) 26:647-650; 和达门欧 (DiMaio) 等人. (1989) 化学会志珀金翻译 (J.Chem.Soc.Perkin Trans), 第1687页; Gly-Ala转角类似物 (Kahn) 等人 (1989) 四面体通讯 (Tetrahedron Lett.) 30:2317; 酰胺键电子等排体 (克劳斯 (Clones) 等人 (1988) 四面体通讯 (Tetrahedron Lett.) 29:3853-3856); 四唑 (泽波库克 (Zabrocki) 等人 (1988) 美国化学学会会志 (J.Am.Chem.Soc.) 110:5875-5880); DTC (萨马宁 (Samanen) 等人 (1990) 国际蛋白质和肽研究杂志 (Int.J.Protein Pep.Res.) 35:501:509); 和以下中教示的类似物: 奥尔森 (Olson) 等人 (1990) 美国化学科学杂志 (J.Am.Chem.Sci.) 112:323-333 和加维 (Garvey) 等人 (1990) 有机化学杂志 (J.Org.Chem.) 56:436。 β 转角和 β 凸起的构象限制模拟物、和含有它们的肽阐述于1995年8月8日颁予卡恩 (Kahn) 的美国专利第5,440,013号中。

[0224] 所属领域的技术人员已知, 可通过将一个或多个的氨基酸用一个或多个的不会改变肽的生物功能的功能等效氨基酸取代来对任何肽进行修饰。在一个方面中, 所述氨基酸经具有类似固有性质 (包括但不限于疏水性、大小或电荷) 的氨基酸取代。用于确定欲取代的适当氨基酸和用于取代的氨基酸的方法已为所属领域的技术人员已知。非限制性实例包括经验的取代模型, 如由达霍夫 (Dahoff) 等人 (1978) 蛋白质序列和结构图册 (In Atlas of Protein Sequence and Structure) 第5卷, 增补2 (编辑达霍夫 (M.O.Dayhoff)), 第345-352页, 国家生物医学研究基金会 (National Biomedical Research Foundation), 华盛顿特区 (Washington DC) 所阐述; 包括达霍夫矩阵的PAM矩阵 (达霍夫 (Dahoff) 等人 (1978), 参考文献同上; 或 JTT 矩阵, 如由琼斯 (Jones) 等人 (1992) 生物科学计算机应用 (Comput.Appl.Biosci.) 8:275-282 和贡内特 (Gonnet) 等人 (1992) 科学 (Science) 256:1443-1445 所阐述; 由阿达池 (Adach) 和长谷川 (Hasegawa) (1996) 分子进化杂志 (J.Mol.Evol.) 42:459-468 所阐述的经验模型; 模块取代矩阵 (BLOSUM), 如由海内考夫 (Henikoff) 和海内考夫 (Henikoff) (1992) 美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 89:10915-10919 所阐述; 泊松模型 (Poisson model), 如由内 (Nei) (1987) 分子进化遗传 (Molecular Evolutionary Genetics.) 纽约哥伦比亚大学出版社 (Columbia University Press, New York) 所阐述; 和最大似然 (Maximum Likelihood) (ML) 方法, 如由穆勒 (Müller) 等人 (2002) 分子生物进化 (Mol.Biol.Evol.) 19:8-13 所阐述。

[0225] 多肽偶联物

[0226] 本发明的多肽和多肽复合物可用于各种制剂, 此刻根据期望用途而变。例如, 一种或多种可以共价或非共价方式连接 (复合) 至各种其它分子, 其性质可根据具体目的而有所变化。例如, 本发明的肽可以共价或非共价方式络合至大分子载体, 所述大分子载体包括 (但不限于) 天然和合成聚合物、蛋白质、多糖、多肽 (氨基酸)、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮和脂质。肽可偶联至脂肪酸以供引入脂质体中, 参见美国专利第5,837,249号。本发明的肽可以共价或非共价方式与固体支持物复合, 各种固体支持物已为本领域所知并阐述于本文中。本发明的抗原肽表位可与抗原呈递基质 (例如MHC复合物) 在有或没有共刺激分子的情况下缔合。

[0227] 蛋白质载体的实例包括 (但不限于) 超抗原、血清白蛋白、破伤风类毒素、卵清蛋白、甲状腺球蛋白、肌球蛋白、和免疫球蛋白。

[0228] 肽-蛋白质载体聚合物可使用常规的交联剂 (例如碳二亚胺) 形成。碳二亚胺的实例是1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基) 碳二亚胺 (CMC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳

二亚胺(EDC)和1-乙基-3-(4-氮鎇-44-二甲基戊基)碳二亚胺(1-ethyl-3-(4-azonia-44-dimethylpentyl)carbodiimide)。

[0229] 其它适宜交联剂的实例是溴化氰、戊二醛和琥珀酸酐。通常,可使用任何数量的双同官能团试剂,其包括双同官能团醛、双同官能团环氧化物、双同官能团亚胺基酯、双同官能团N-羟基琥珀酰亚胺酯、双同官能团马来酰亚胺、双同官能团烷基卤化物、双同官能团吡啶基二硫化物、双同官能团芳基卤化物、双同官能团肼、双同官能团二偶氮鎇衍生物和双同官能团光反应性化合物。还包括双异官能团化合物,例如,具有胺反应性基团和巯基反应性基团的化合物、具有胺反应性基团和光反应性基团的化合物和具有羰基反应性基团和巯基反应性基团的化合物。

[0230] 所述双同官能团交联剂的特定实例包括双官能N-羟基琥珀酰亚胺酯,二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯、和二琥珀酰亚胺基酒石酸酯;双官能亚胺酯,己二亚氨酸二甲酯、庚二亚氨酸二甲酯和辛二亚氨酸二甲酯;双官能巯基反应性交联剂,1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫基)丙酰胺基]丁烷、双马来酰亚胺基己烷和双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷;双官能芳基卤化物,1,5-二氟-2,4-二硝基苯和4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜;双官能光反应性试剂,例如双-[b-(4-叠氮基水杨酰基酰胺基)乙基]二硫化物;双官能醛,甲醛、丙二醛、琥珀醛、戊二醛和己二醛;双官能环氧化物,例如1,4-丁二醇二缩水甘油醚;双官能肼,己二酸二肼、碳酸肼和琥珀酸二肼;双官能重氮盐,联邻甲苯胺、重氮化和双重氮化联苯胺;双官能烷基卤化物,N1N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)、N1N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)、N1N'-十一亚甲基-双(碘乙酰胺);以及苄基卤化物和卤基氮芥,分别如ala'-二碘-对-二甲苯磺酸和三(2-氯乙基)胺。

[0231] 可用于实施蛋白质至肽偶联的常用双异官能团交联剂的实例包括(但不限于)SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)、MBS(间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、SIAB(N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰胺基)氨基苯甲酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯)、GMBS(N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯)、MPBH(4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸肼)、M2C2H(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-肼)、SMPT(琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯)、和SPDP(N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)。

[0232] 交联也可通过还原胺化将羰基偶合至胺基团或至肼基团来完成。

[0233] 本发明的肽也可作为非共价连接的单体通过离子、吸附或生物特异性相互作用来调配。肽与高度带正电荷或带负电荷的分子的复合物可通过在低离子强度环境(例如于去离子水中)下形成盐桥来达成。大的复合物可使用诸如聚-(L-谷氨酸)或聚-(L-赖氨酸)(其分别含有许多负电荷和正电荷)等带电荷聚合物来形成。肽可吸附至表面(例如,微粒乳胶珠粒)或吸附至其它疏水聚合物,以形成有效模拟交联或化学聚合蛋白质的非共价连接的肽-超抗原复合物。最后,肽可通过使用其它分子间的生物特异性相互作用非共价连接。例如,利用生物素对蛋白质(例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白或其衍生物)的强亲和力可用于形成肽复合物。这些生物素结合蛋白质含有四个结合位点,所述结合位点可与溶液中的生物素相互作用或共价附接至另一分子。(参见威尔柴可(Wilchek)(1988)生物化学年鉴(Anal.Biochem.)171:1-32)。肽可使用常用生物素化试剂(例如D-生物素的N-羟基琥珀酰亚胺基酯(NHS-生物素),其与蛋白质上可用胺基团反应)进行修饰以具有生物素基团。然

后,生物素化的肽可与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白一起培养以形成大的复合物。所述聚合物的分子质量可通过仔细控制生物素化的肽与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的摩尔比例来调节。

[0234] 本申请案还提供本文所述偶联至标记(例如,荧光或生物发光标记)的肽和多肽用于诊断方法中。例如,以可检测方式标记的肽和多肽可结合至柱并用于检测和纯化抗体。适宜荧光标记包括(但不限于)荧光素、若丹明(rhodamine)、四甲基若丹明、曙红、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、芘、孔雀绿、均二苯乙烯、萤光黄、瀑布蓝™、和德克萨斯红。其它适宜光学染料阐述于豪格兰(Haugland)、理查德(Richard P.) (1996) 分子探针手册(Molecular Probes Handbook)中。

[0235] 本发明的多肽也可与不同液相载体(例如无菌或水溶液、药学上可接受的载体、悬浮液和乳液)组合。非水性溶剂的实例包括丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。当用于制备抗体时,载体也可包括用于非特异性加强特定免疫反应的佐剂。所属领域的技术人员可容易地确定是否需要佐剂并选择一种佐剂。然而,仅出于阐释的目的,适宜佐剂包括(但不限于)弗罗因德氏(Freund)完全佐剂、弗罗因德氏不完全佐剂和无机盐。

[0236] 宿主细胞

[0237] 还提供包含本发明一种或多种的多肽的宿主细胞。在一个方面中,所述多肽被表达并呈现于细胞表面上(细胞外)。含有本发明多肽的适宜细胞包括原核和真核细胞,其包括(但不限于)细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、动物细胞、哺乳动物细胞、鼠科动物细胞、大鼠细胞、绵羊细胞、类人猿细胞和人类细胞。细菌细胞的实例包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*)。所述细胞可自商业供应商购买,例如美国典型培养物保藏中心(the American Type Culture Collection) (ATCC,美国马里兰州洛克维尔(Rockville Maryland),USA),或使用本领域所知的方法自分离物培养。适宜真核细胞的实例包括(但不限于)293THEK细胞、以及仓鼠细胞系CHO、BHK-21;指定为NIH3T3、NS0、C127的鼠科动物细胞系、类人猿细胞系COS、Vero和人类细胞系HeLa、PER.C6(自克鲁赛尔(CruceIl) 购得)U-937和HepG2。昆虫细胞的非限制性实例包括草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)。用于表达的酵母的实例包括(但不限于)酵母菌属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、假丝酵母属(*Candida*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)、西洋蓍霉属(*Yarrowia*)、或毕赤酵母属(*Pichia*)。参见例如美国专利第4,812,405号;第4,818,700号;第4,929,555号;第5,736,383号;第5,955,349号;第5,888,768号和第6,258,559号。

[0238] 除物种特异性以外,细胞可为任何具体组织类型,例如神经元,或另一选择为体细胞或胚胎干细胞,例如可能或可能不分化成神经细胞的干细胞,例如,胚胎干细胞、脂肪干细胞、神经元干细胞和造血干细胞。所述干细胞可为人类或动物来源(例如哺乳动物)。

[0239] 分离的多核苷酸和组合物

[0240] 本发明还提供以上所鉴别序列的互补多核苷酸或其补体。互补性可使用传统杂交在中等或高度严格的条件下确定。如本文所用,术语多核苷酸欲指DNA和RNA以及经修饰的核苷酸。例如,本发明还提供反义多核苷酸链,例如这些序列的反义RNA或其补体。

[0241] 还提供编码与本发明多肽和多肽复合物实质上同源且生物上等效的多肽的多核苷酸。实质上同源且生物上等效意指那些满足以下条件者:具有不同程度的同源性(例如至

少65%、或另一选择至少70%、或另一选择至少75%、或另一选择至少80%、或另一选择至少85%、或另一选择至少90%、或另一选择至少95%、或另一选择至少97%同源,如上文所定义)且编码对结合因子Xa抑制剂具有生物活性的多肽且不会组装成凝血酶原酶复合物(如本文所述)。应了解,尽管未必明确陈述,但关于实质上同源多肽和多核苷酸的实施例意欲用于本发明的各个方面,例如,多肽、多核苷酸和抗体。

[0242] 本发明的多核苷酸可使用传统重组技术复制。另一选择为,多核苷酸可使用PCR技术复制。PCR是美国专利第4,683,195号;第4,800,159号;第4,754,065号;和第4,683,202号的主题且阐述于PCR:聚合酶链反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)(穆利斯(Mullis)等人编辑,伯克豪舍出版社(Birkhauser Press),波士顿(Boston)(1994))和其中所引用参考文献中。再进一步,所属领域的技术人员可使用本文所提供的序列和市售DNA合成器来复制DNA。因此,本发明还提供获得本发明多核苷酸的方法,其通过提供多核苷酸的线性序列、适宜引物分子、化学品(例如酶)和用于其复制的说明书并以化学方式复制或适当定向连接核苷酸以获得所述多核苷酸。在单独实施例中,这些多核苷酸进一步经分离。再进一步来说,所属领域的技术人员可将多核苷酸可操作地连接至调控序列用于其在宿主细胞中的表达。所述多核苷酸和调控序列插入宿主细胞(原核或真核)中用于复制和扩增。如此扩增的DNA可通过所属领域的技术人员已知的方法从细胞分离。本文进一步提供用于通过所述方法获得多核苷酸的方法以及如此获得的多核苷酸。

[0243] RNA可通过首先将DNA多核苷酸插入适宜原核或真核宿主细胞中来获得。所述DNA可通过任何适当方法来插入,例如,通过使用适当基因递送运载体(例如,脂质体、质粒或载体)或通过电穿孔。当将细胞复制并将DNA转录成RNA时;然后可使用所属领域的技术人员已知的方法分离RNA,例如,如阐述于萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell)(2001)参考文献同上中。例如,mRNA可使用各种分解酶或化学溶液根据萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell)(2001)参考文献同上中所阐述的程序来分离或根据制造商提供的说明书通过核酸结合树脂来提取。

[0244] 在一个方面中,RNA是短干扰RNA,其还称为siRNA。制备和筛选干扰RNA和针对阻断多核苷酸表达的能力进行选择的方法已为本领域所知且其非限制性实例展示于下文中。本发明提供这些干扰RNA。

[0245] siRNA序列可通过以下来设计:获得靶mRNA序列并确定适当siRNA互补序列。本发明的siRNA经设计以与靶序列相互作用,此意味着其与所述序列充分杂交的靶序列互补。siRNA与所述靶序列可100%相同。然而,siRNA序列与靶序列的同源性可小于100%,只要siRNA可与靶序列杂交即可。因此,例如,siRNA分子可与靶序列或靶序列的补体至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。因此,也可使用相对于靶具有插入、缺失或单点突变的siRNA分子。建议对每个靶mRNA产生的许多不同siRNA序列针对最优靶序列进行筛选。应实施同源性搜索(例如BLAST搜索)以确保所述siRNA序列与任何已知哺乳动物基因不含有同源性。

[0246] 通常,优选地靶序列位于自靶mRNA的AUG起始密码子至少100-200个核苷酸处且距离终止密码子至少50-100个核苷酸(达克斯伯里(Duxbury)(2004)外科研究杂志(J.Surgical Res.)117:339-344)。

[0247] 研究者已确定,某些特征是有效使其靶基因沉默的siRNA分子中所共有的(达克斯

伯里 (Duxbury) (2004) 外科研究杂志 (J.Surgical Res.) 117:339-344; 牛耳地 (Ui-Tei) 等人 (2004) 核酸研究 (Nucl.Acids Res.) 32:936-48)。作为通用指南,在哺乳动物细胞基因沉默中包括一个或多个的以下条件的siRNA尤其有用:GC比例在45%至55%之间,各段不超过9个G/C残基、G/C在有义链的5'端;A/U在反义链的5'端;和在反义链的5'末端的前7个碱基中有至少5个A/U残基。

[0248] 通常,siRNA的长度为约10个至约30个核苷酸。例如,siRNA可为10-30个核苷酸长、12-28个核苷酸长、15-25个核苷酸长、19-23个核苷酸长、或21-23个核苷酸长。当siRNA含有两个不同长度的链时,较长的链指定所述siRNA的长度。在此情况下,较长链的未配对核苷酸将形成突出端。

[0249] 术语siRNA包括短发夹RNA(shRNA)。shRNA含形成茎-环结构的单链RNA,其中所述茎由互补的构成双链siRNA的有义链和反义链组成,且所述环是不同大小的接头。shRNA的茎结构通常为约10个至约30个核苷酸长。例如,所述茎可为10-30个核苷酸长、12-28个核苷酸长、15-25个核苷酸长、19-23个核苷酸长、或21-23个核苷酸长。

[0250] 用以帮助siRNA设计的工具可容易地公开获得。例如,基于计算机的siRNA设计可在因特网www.dharmacon.com处获得,最后一次登录是在2007年11月26日。

[0251] dsRNA和siRNA的合成

[0252] dsRNA和siRNA可以化学或酶方式在体外合成,如米克若 (Micura) (2002) 应用化学国际版 (Agnes Chem.Int.Ed.Emgl.) 41:2265-2269;倍慈 (Betz) (2003) 普罗米加说明 (Promega Notes) 85:15-18;和帕德森 (Paddison) 和汉农 (Hannon) (2002) 癌症细胞 (Cancer Cell) 2:17-23中所阐述。化学合成可通过手动或自动方法来实施,两种方法均为所属领域的技术人员所已知,如在米克若 (Micura) (2002),参考文献同上中所阐述。siRNA也可以shRNA形式内源性表达于细胞内部,如Yu等人 (2002) 美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 99:6047-6052;麦克马纳斯 (McManus) 等人 (2002) RNA 8:842-850中所阐述。内源性表达已使用基于质粒的表达系统使用小核RNA启动子 (例如RNA聚合酶III U6或H1、或RNA聚合酶II U1) 来达成,如在布若莫坎普 (Brummelkamp) 等人 (2002) 科学 (Science) 296:550-553 (2002);和诺瓦里诺 (Novarino) 等人 (2004) 神经科学杂志 (J.Neurosci.) 24:5322-5330中所述。

[0253] 体外酶dsRNA和siRNA合成可使用RNA聚合酶介导的过程来实施以在递送至所选细胞之前产生体外退火的单独有义链和反义链,如法耶 (Fire) 等人 (1998) 自然 (Nature) 391:806-811;东泽 (Donze) 和皮卡德 (Picard) (2002) 核酸研究 (Nucl.AcidsRes.) 30 (10):e46;Yu等人 (2002);和施埃莫 (Shim) 等人 (2002) 生物化学杂志 (J.Biol.Chem.) 277:30413-30416中所阐述。有许多制造商 (普罗米加 (Promega)、安彼讷 (Ambion),新英格兰生物实验室 (New England Biolabs) 和斯隆珍 (Stragene)) 制造用于实施体外合成的转录试剂盒。

[0254] siRNA的体外合成可 (例如) 通过使用一对在有义和反义RNA序列的上游含有T7RNA聚合酶启动子的短双链体寡核苷酸作为DNA模板来实施。所述双链体中的每一寡核苷酸是用于合成siRNA的一个链的单独模板。然后将所合成的单独短RNA链退火以形成siRNA,如在方案和应用 (Protocols and Applications),第2章:RNA干扰 (Chapter 2:RNA interference),普罗米加公司 (Promega Corporation), (2005) 中所阐述。

[0255] dsRNA的体外合成可通过 (例如) 使用在两个DNA靶序列链的5'-端的T7RNA聚合酶

启动子来完成。此通过使用单独DNA模板来完成,每一个模板含有相对于T7启动子为不同定向的靶序列,其在两个单独反应中进行转录。将所得转录物混合并进行转录后退火。用于此反应中的DNA模板可通过PCR产生或通过使用两个线性化质粒模板来形成,每一模板在靶序列的不同端处含有T7聚合酶启动子。方案和应用(Protocols and Applications),第2章:RNA干扰(Chapter 2:RNA interference),普罗米加公司(Promega Corporation), (2005)。

[0256] 为表达本文所阐述的蛋白质,可通过若干种技术递送编码所关注基因的核酸序列的递送。所述技术的实例包括病毒技术(例如,逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、甲病毒载体和诸如此类)和非病毒技术(例如,DNA/脂质体复合物、胶束和靶向病毒蛋白质-DNA复合物),如本文所述。一旦在所关注细胞的内部,则可在遍在启动子(例如,EF-1 α)或组织特异性启动子(例如,钙调蛋白激酶2 (CaMKI) 启动子、NSE启动子和人类Thy-1启动子)的控制下进行转基因的表达。另一选择为,可通过使用诱导型启动子系统(例如,Tet启动/关闭启动子)控制表达水平,如维泽诺威赤(Wiznerowicz)等人(2005)干细胞(Stem Cells) 77:8957-8961中所述。

[0257] 启动子的非限制性实例包括(但不限于)巨细胞病毒(CMV)启动子(坎普雷特(Kaplitt)等人(1994)自然遗传学(Nat.Genet.) 8:148-154)、CMV/人类 β 3-球蛋白启动子(曼德尔(Mandel)等人(1998)神经科学杂志(J.Neurosci.) 18:4271-4284)、NCX1启动子、 α MHC启动子、MLC2v启动子、GFAP启动子(徐(Xu)等人(2001)基因理论(Gene Ther.), 8:1323-1332)、1.8-kb神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(克莱因(Klein)等人(1998)实验神经学(Exp.Neurol.) 150:183-194)、鸡 β 肌动蛋白(CBA)启动子(宫崎(Miyazaki) (1989)基因(Gene) 79:269-277)和 β -葡萄糖苷酸酶(GUSB)启动子(西普利(Shiple)等人(1991)遗传学(Genetics) 10:1009-1018)、人类血清白蛋白启动子、 α -1-抗胰蛋白酶启动子。为提高表达,可将其它调控元件额外可操作地连接至转基因,例如,土拨鼠肝炎病毒后调控元件(Woodchuck Hepatitis Virus Post-Regulatory Element) (WPRE) (戴鲁(Donello)等人(1998)病毒学杂志(J.Virol.) 72:5085-5092)或牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化位点。

[0258] 本文还提供多核苷酸探针或引物,其包含至少10个、或另一选择至少17个或另一选择至少20个、或另一选择至少50个、或另一选择至少75个编码SEQ ID NO:12至15或其补体的多核苷酸、或另一选择至少100个多核苷酸。适宜探针和引物阐述于同上参考文献中。本领域中已知,特定杂交不需要“完全匹配的”探针。通过取代、缺失或插入少量碱基所达成的探针序列的微小改变并不影响杂交特异性。通常,可容许多达20%碱基对错配(当进行最佳比对时)。用于检测上述mRNA的探针与先前所鉴别序列(以上所鉴别)(其对应于先前所表征的本发明多核苷酸)中所含的相当大小的同源区具有至少约80%同一性。另一选择为,与同源区进行比对之后,探针与相应基因序列具有85%同一性;且再进一步,其展示90%同一性,或更进一步至少95%同一性。

[0259] 这些探针可用于放射性分析(例如,Southern和Northern印迹分析)以检测或监测本发明多核苷酸或多肽的表达。探针也可附接至固体支持物或阵列(例如芯片)用于高通量筛选分析来检测对应于本发明一种或多种的多核苷酸的基因的表达。

[0260] 本发明的多核苷酸和上述多核苷酸的片段也可作为引物用于检测表达于神经元细胞中的基因或基因转录物以(例如)证实多核苷酸转导于宿主细胞中。在这方面,扩增是指使用能够以合理的保真度复制靶序列的引物依赖性聚合酶的任何方法。扩增可通过天然

或重组DNA聚合酶(例如T7DNA聚合酶)、大肠杆菌(E.coli)DNA聚合酶的克列诺(Klenow)片段、和逆转录酶进行。引物长度与以上针对探针所鉴定的长度一样。

[0261] 本发明进一步提供本发明可操作地连接至RNA转录的启动子、以及用于复制和/或暂时或稳定地表达DNA或RNA的其它调控序列的分离的多核苷酸。本文所用术语“可操作地连接”是指以启动子将指导转录RNA离开DNA分子的方式定位。所述启动子的实例是SP6、T4和T7。在某些实施例中,细胞特异性启动子用于细胞特异性表达所插入的多核苷酸。含有启动子或启动子/增强子、具有终止密码子和可选标志序列、以及可在其中将DNA的插入片段可操作地连接至所述启动子的克隆位点的载体已为本领域所知且有市售。对于通用方法和克隆技术,参见基因表达技术(Gene Expression Technology)(高埃道(Goeddel)编辑,学术出版社公司(Academic Press, Inc.) (1991))和其中所引用的参考文献和载体:基本数据系列(Vectors: Essential Data Series)(加切沙(Gacesa)和拉姆吉(Ramji)编辑,威利父子(John Wiley & Sons),纽约(N.Y.) (1994)),其含有关于各种适宜载体的图谱、功能性质、商业供应商和GenEMBL登录号参考。优选的,这些载体能够在体外或体内转录RNA。

[0262] 使用含有这些核酸的表达载体用于以获得宿主载体系统来产生蛋白质和多肽。此暗示,这些表达载体必须在宿主有机体中作为附加体或作为染色体DNA的整合部分来复制。适宜表达载体包括质粒,病毒载体,包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、粘粒等。腺病毒载体对于在体内将基因引入组织中尤其有用,这是因为其在体外和体内二者中高表达水平和细胞的有效转化。当将核酸插入适宜宿主细胞(例如,原核或真核细胞)且宿主细胞进行复制时,可以重组方式产生蛋白质。适宜宿主细胞将取决于载体且可包括哺乳动物细胞、动物细胞、人类细胞、类人猿细胞、昆虫细胞、酵母细胞、和细菌细胞,如上文所述并使用已知方法构建。参见萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell) (2001),参考文献同上。除使用病毒载体用于将外源性核酸插入细胞中以外,可通过本领域中已知的方法将核酸插入宿主细胞中,例如,对于细菌细胞进行转化;对于哺乳动物细胞,使用磷酸钙沉淀进行转染;DEAE-葡聚糖;电穿孔;或显微注射。对于此方法参见萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell) (2001),参考文献同上。

[0263] 本发明还提供适用于将本发明的多核苷酸递送至细胞中(无论是体内、离体还是体外)的递送运载体。本发明的多核苷酸可包含于基因递送运载体、克隆载体或表达载体中。这些载体(尤其表达载体)进而可经操纵以设想可(例如)促使递送至和/或进入细胞的许多形式中的任一者。

[0264] 这些含本发明的多核苷酸的经分离宿主细胞用于多核苷酸的重组复制且用于肽的重组产生且用于高通量筛选。

[0265] 本发明的多核苷酸可偶联至可检测标记或与诸如固体支持物或药学上可接受的载体等载体组合。适宜固体支持物阐述于上文中且同样也具有适宜标记。将标记附接至多核苷酸的方法已为所属领域的技术人员熟知。参见萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell) (2001),参考文献同上。

[0266] 治疗抗体组合物

[0267] 本发明还提供能够与本发明的蛋白质或多肽特异性形成复合物的抗体,其用于本发明的治疗方法中。术语“抗体”包括多克隆抗体和单克隆抗体、抗体片段、以及其衍生物(上文中所阐述者)。所述抗体包括(但不限于)小鼠、大鼠和家兔或人类抗体。抗体可在细胞

培养物、噬菌体、或各种动物中产生,其包括(但不限于)牛、家兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、天竺鼠、绵羊、狗、猫、猴、黑猩猩、类人猿等。抗体还用于鉴别和纯化治疗多肽。

[0268] 本发明还提供包含上述抗体和特异性结合至所述抗体的多肽的抗体-肽复合物。在一个方面中,所述多肽是受到对抗可产生抗体的多肽。在一个方面中,抗体-肽复合物是分离的复合物。在再一方面中,所述复合物的抗体是(但不限于)多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体或抗体衍生物,如本文所述。抗体-肽复合物的抗体或肽中的任一者或二者可以可检测方式标记。在一个方面中,本发明的抗体-肽复合物可在诊断或筛选分析中作为对照或参考样品。

[0269] 本发明的多克隆抗体可使用本领域已熟知且文献中已充分阐述的传统技术来生成。存在许多用于产生多克隆抗体的方法。例如,多克隆抗体通常通过对适宜哺乳动物(例如但不限于鸡、山羊、天竺鼠、仓鼠、马、小鼠、大鼠和家兔)进行免疫来产生。将抗原注射于哺乳动物中,此诱使B-淋巴细胞产生特异性针对所述抗原的IgG免疫球蛋白。自哺乳动物血清纯化此IgG。此方法的各种变化形式包括改变佐剂、施用途径和位点、每一位点的注射体积和每种动物位点的数量用于最优生产和动物的更人道对待。例如,通常使用佐剂以提高或增强对抗原的免疫反应。大多数佐剂提供注射位点抗原储积,此允许抗原缓慢释放至引流淋巴结。其它佐剂包括提高蛋白质抗原分子在大表面积上的浓度的表面活性剂和免疫刺激分子。用于多克隆抗体生成的佐剂的非限制性实例包括弗罗因德氏(Freund)佐剂、瑞比(Ribi)佐剂系统和替特马斯(Titermax)。多克隆抗体可使用阐述于美国专利第7,279,559号;第7,119,179号;第7,060,800号;第6,709,659号;第6,656,746号;第6,322,788号;第5,686,073号;和第5,670,153号中的方法生成。

[0270] 本发明的单克隆抗体可使用本领域已熟知且文献中已充分阐述的传统杂交瘤技术来生成。例如,杂交瘤是通过融合适宜永生细胞系(例如,骨髓瘤细胞系,例如但不限于Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2SA3、Sp2MAI、Sp2SS1、Sp2SA5、U397、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A、CHO、PerC.6、YB2/O)或诸如此类、或异源骨髓瘤、其融合产物、或源自其的任何细胞或融合细胞、或本领域已熟知的任何其它适宜细胞系(参见例如, www.atcc.org、www.lifetech.com。(最后一次登录在2007年11月26日)、和诸如此类)与产生抗体的细胞(例如但不限于经分离或克隆的脾脏、外周血、淋巴、扁桃体、或其它免疫或含B细胞的细胞)、或表达重链或轻链恒定区或可变区或框架或CDR序列(无论是作为内源性还是异源性核酸、是重组的还是内源性的、病毒、细菌、藻类、原核动物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿类动物、马科动物、羊、山羊、绵羊、灵长目动物、真核生物的、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交和的诸如此类或其任何组合)的任何其它细胞而产生。产生抗体的细胞也可自己用所关注抗原免疫的人类或其它适宜动物的外周血、或优选地脾脏或淋巴节获得。任何其它适宜宿主细胞也可用于表达编码本发明抗体、其特定片段或变体的异源性或内源性核酸。经融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可使用选择性培养条件或其它适宜已知方法来分离,并通过有限稀释或细胞分选或其它已知方法来克隆。

[0271] 在一个实施例中,本文所述的抗体可使用多抗原肽(MAP)系统来生成。所述MAP系统利用有三个或七个放射状支化赖氨酸残基的肽基核心,其上可使用标准固相化学建立所

关注的抗原肽。所述赖氨酸核心产生具有约4至8个肽表位拷贝的MAP,此取决于通常占总分子量的小于10%的内部核心。所述MAP系统不需要载体蛋白用于偶联。MAP中抗原表位多个拷贝的高摩尔比和致密堆积已展示产生强烈的免疫原性反应。此方法阐述于美国专利第5,229,490号中且此专利其整体以引用方式并入本文中。

[0272] 可使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其它适宜方法,其包括(但不限于)使用本领域中已知的方法自肽或蛋白质文库(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA、或诸如此类,展示文库;例如,自各个商业供应商购得者,例如剑桥抗体技术(Cambridge Antibody Technologies)(英国剑桥(Cambridgeshire,UK))、莫弗西斯(MorphoSys)(德尔马丁斯瑞德/普拉内格(Martinsreid/Planegg,Del))、巴尔威申(Biovation)(英国苏格兰阿伯丁(Aberdeen,Scotland,UK))、巴沃温特(BioInvent)(瑞士隆德(Lund,Sweden))选择重组抗体的方法。参见美国专利第4,704,692号;第5,723,323号;第5,763,192号;第5,814,476号;第5,817,483号;第5,824,514号;第5,976,862号。替代方法依赖于转基因动物的免疫(例如,SCID小鼠,缪格曼(Nguyen)等人(1977)微生物免疫学(Microbiol.Immunol.)41:901-907(1997);格桑德(Sandhu)等人(1996)生物技术评论(Crit.Rev.Biotechnol.)16:95-118;尔恩(Eren)等人(1998)免疫学(Immunol.)93:154-161),其能够产生人类抗体的谱型(repertoire),如本领域所知和/或如本文所阐述。所述技术包括(但不限于)核糖体展示(黑恩斯(Hanes)等人(1997)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),94:4937-4942;黑恩斯(Hanes)等人(1998)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),95:14130-14135);单细胞抗体产生技术(例如,选定淋巴细胞抗体方法(“SLAM”)(美国专利第5,627,052号,文(Wen)等人(1987)免疫学杂志(J.Immunol.)17:887-892;巴博库(Babcock)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)(1996)93:7843-7848);凝胶微滴和流动细胞术(鲍威尔(Powell)等人(1990)生物技术(Biotechnol.)8:333-337;一个细胞系统(One Cell Systems)(马萨诸塞州剑桥(Cambridge,Mass));格雷(Gray)等人(1995)J.Imm.Meth.182:155-163;和Kenny等人(1995)生物技术(Bio.Technol.)13:787-790);B-细胞选择(思迪恩巴克(Steenbakkers)等人(1994)分子生物报告(Molec.Biol.Reports)19:125-134。

[0273] 本发明的抗体衍生物可通过将编码本发明抗体的多核苷酸递送至适宜宿主(例如,用以提供在乳液中产生所述抗体的转基因动物或哺乳动物,例如山羊、牛、马、绵羊和诸如此类)来制备。这些方法已为本领域所知且阐述于例如美国专利第5,827,690号;第5,849,992号;第4,873,316号;第5,849,992号;第5,994,616号;第5,565,362号;和第5,304,489号中。

[0274] 术语“抗体衍生物”包括对抗体或片段的线性多肽序列的翻译后修饰。例如,美国专利第6,602,684B1号阐述生成抗体(其包括整个抗体分子、抗体片段、或包括与免疫球蛋白的Fc区等效的区的融合蛋白质且具有经增强Fc介导的细胞毒性)经修饰的二醇形式的方法和如此生成的糖蛋白。

[0275] 抗体衍生物也可通过递送本发明的多核苷酸以提供转基因植物和经培养植物细胞(例如但不限于烟草、玉米和浮萍)来制备,在植物部分或自其培养的细胞中产生所述抗体、特定部分或变体。举例而言,克雷默(Cramer)等人(1999)微生物学与免疫学的当前课题

(Curr.Top.Microbol.Immunol.) 240:95-118和其中所引用的参考文献阐述例如使用诱导型启动子产生表达大量重组蛋白质的转基因烟草叶。转基因玉米已用于在商业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其中生物活性等效于那些在其它重组系统所产生或自天然来源纯化所得的生物活性。参见例如胡德(Hood)等人(1999)实验医学与生物学进展(Adv.Exp.Med.Biol.) 464:127-147和其中所引用的参考文献。抗体衍生物也可自包括诸如单链抗体(scFv)等抗体片段的转基因植物种子(包括烟草种子和马铃薯块茎)大量产生。参见例如,康拉德(Conrad)等人(1998)植物分子生物学(Plant Mol.Biol.) 38:101-109和其中所引用的参考文献。因此,本发明的抗体也可使用转基因植物根据已知方法来制备。

[0276] 抗体衍生物还可通过(例如)添加外源性序列以修饰免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力(affinity)、结合速率、解离速率、亲和性(avidity)、特异性、半寿期或任何其它适宜特性。通常,维持非人类或人类CDR序列的一部分或全部,而可变区和恒定区的非人类序列由人类或其它氨基酸替代。

[0277] 通常,CDR残基直接参与对抗原结合的影响且影响实质上最大。本发明抗体的人源化或工程化可使用任何已知方法来实施,例如但不限于那些阐述于以下中者:美国专利第5,723,323号;第5,976,862号;第5,824,514号;第5,817,483号;第5,814,476号;第5,763,192号;第5,723,323号;第5,766,886号;第5,714,352号;第6,204,023号;第6,180,370号;第5,693,762号;第5,530,101号;第5,585,089号;第5,225,539号;和第4,816,567号。

[0278] 用于制备部分至完全人类抗体的技术已为本领域所知且可使用任何所述技术。根据一个实施例,完全人类抗体序列是在已经工程化以表达人类重链和轻链抗体基因的转基因小鼠中制得。已经制得可产生不同类型抗体的所述转基因小鼠的多个株。正产生合意抗体的转基因小鼠的B细胞可经融合以获得用于连续产生期望抗体的杂交瘤细胞系。(参见例如拉塞(Russel)等人,(2000)感染与免疫(Infection and Immunity) 2000年4月:1820-1826;盖洛(Gallo)等人(2000)欧洲免疫学杂志(European J.of Immun.30:534-540;格林(Green) (1999)免疫方法杂志(J.of Immun.Methods) 231:11-23;杨(Yang)等人(1999A)白细胞生物学杂志(J.of Leukocyte Biology) 66:401-410;杨(Yang) (1999B)癌症研究(Cancer Research) 59(6):1236-1243;杰克保威茨(Jakobovits) . (1998)先进药物输送评论(Advanced Drug Delivery Reviews) 31:33-42;格林(Green)和杰克保威茨(Jakobovits) (1998)实验医学杂志(J.Exp.Med.) 188(3):483-495;杰克保威茨(Jakobovits) (1998)研发中药物的实验评述(Exp.Opin.Invest.Drugs) 7(4):607-614;津田(Tsuda)等人(1997)基因组学(Genomics) 42:413-421;谢尔曼金-戈尔德(Sherman-Gold) (1997)基因工程新闻(Genetic Engineering News) 17(14);门德斯(Mendez)等人(1997)自然遗传学(Nature Genetics) 15:146-156;杰克保威茨(Jakobovits) (1996)威尔的实验免疫学手册,综合免疫系统(Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System) 第IV卷,194.1-194.7;杰克保威茨(Jakobovits) (1995)生物技术近期评述(Current Opinion in Biotechnology) 6:561-566;门德斯(Mendez)等人(1995)遗传学(Genomics) 26:294-307;杰克保威茨(Jakobovits) (1994)现代生物学(Current Biology) 4(8):761-763;阿保尼斯(Arbones)等人(1994)免疫(Immunity) 1(4):247-260;杰克保威茨(Jakobovits) (1993)自然(Nature) 362(6417):255-258;杰克保威茨(Jakobovits)等人(1993)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 90(6):2551-

2555;和美国专利第6,075,181号)。

[0279] 本发明的抗体也可经修饰以形成嵌合抗体。嵌合抗体是那些抗体的重链和轻链的各个结构域由来自超过一种的物种的DNA编码的抗体。参见例如美国专利第4,816,567号。

[0280] 另一选择为,本发明的抗体也可经修饰以形成覆盖抗体。覆盖抗体是那些其中一种物种的抗体的外部氨基酸残基慎重地(judiciously)由第二种物种抗体的外部氨基酸残基替代或“覆盖”的抗体以便所述第一物种的抗体在第二种物种中将不会有免疫原性,由此降低抗体的免疫原性。由于蛋白质的抗原性主要取决于其表面的性质,所以抗体的免疫原性将通过替代不同于在另一种哺乳动物物种抗体中所发现的残基的暴露残基而降低。外部残基的此慎重替代对内部结构域或对结构域间接接触将具有较少或没有影响。因此,配体结合性质将由于变化限于可变区框架残基而不受影响。由于仅改变抗体的外表面或外皮而支撑残基保持未变,故此过程称为“覆盖”。

[0281] “覆盖”的程序利用人类抗体可变结构域的可用序列数据,所述序列数据由卡巴特(Kabat)等人(1987)免疫学所关注蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第4版,马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md.),美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)编制,此数据库的更新、和其它可访问的美国和其它国家的数据库(核酸和蛋白质二者)。用于生成覆盖抗体的方法的非限制性实例包括EP 519596;美国专利第6,797,492号;和帕德兰(Padlan)等人(1991)分子免疫学(Mol.Immunol.) 28(4-5):489-498)。

[0282] 术语“抗体衍生物”还包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段的“双特异性抗体”,其中片段包含在同一多肽链中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。(参见例如EP 404,097;WO 93/11161;和霍林格(Hollinger)等人(1993)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 90:6444-6448)。通过使用太短而无法使同一链上两个结构域配对的接头,所述结构域被迫与另一链上的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点。(也参见颁予陈(Chen)等人的美国专利第6,632,926号,所述专利揭示抗体变体,其具有一个或多个的插入亲代抗体的超变区中的氨基酸且对靶抗原的结合亲和力比亲代抗体对抗原的结合亲和力强至少约2倍。)

[0283] 术语“抗体衍生物”进一步包括“线性抗体”。制作线性抗体的程序本领域已熟知且阐述于泽帕德(Zapata)等人(1995)蛋白质工程(Protein Eng.) 8(10):1057-1062中。简言之,这些抗体包含一对串联Fd区段(V_H-C_H1-V_H-C_H1),其形成一对抗原结合区。线性抗体可具有双特异性或单特异性。

[0284] 本发明的抗体可通过已知方法自重组细胞培养物回收并纯化,其包括(但不限于)蛋白质A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析(“HPLC”)也可用于纯化。

[0285] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物和通过重组技术从真核宿主(例如,酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)或另一选择从原核细胞产生的产物,如上文所述。

[0286] 若所测试单克隆抗体与蛋白质或多肽结合,则所测试抗体与由本发明的杂交瘤所提供的抗体等效。还可在无需过多试验的情况下通过确定所测试抗体是否防止本发明的单

克隆抗体结合通常与单克隆抗体反应的蛋白质或多肽来确定抗体是否具有与本发明的单克隆抗体相同的特异性。如果所测试抗体与本发明的单克隆抗体竞争(如通过本发明单克隆抗体的结合减少所展示),则很可能两个抗体结合至相同或密切相关的表位。另一选择为,本发明的单克隆抗体可与通常与其反应的蛋白质一起预先培育,并确定所测试单克隆抗体其结合抗体的能力是否受到抑制。如果所测试单克隆抗体受到抑制,则其很可能具有与本发明的单克隆抗体相同或密切相关的表位特异性。

[0287] 术语“抗体”还意欲包括抗体的所有同种型。单克隆抗体的特定同种型可直接通过自初始融合开始进行选择来制备,或其次自分泌不同同种型的单克隆抗体的亲代杂交瘤开始通过血缘选择技术来制备以使用阐述于以下中的程序分离类型转换变体:斯德普乐思科(Steplewski)等人(1985)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 82:8653;或皮拉(Spira)等人(1984)免疫方法杂志(J.Immunol.Methods) 74:307。

[0288] 分泌具有本发明单克隆抗体的特异性的单克隆抗体的其它杂交瘤的分离也可由所属领域的普通技术人员通过产生抗独特型(anti-idiotypic)抗体来完成。赫里恩(Herlyn)等人(1986)科学(Science) 232:100。抗独特型抗体是一种识别由所关注杂交瘤产生的单克隆抗体上存在的独特决定子的抗体。

[0289] 两个杂交瘤的单克隆抗体之间的独特型同一性表明所述两个单克隆抗体就其相同抗原决定部位决定子的识别来说相同。因此,通过使用针对单克隆抗体上的抗原决定部位决定子的抗体,可能鉴别出表达具有相同抗原决定部位特异性的单克隆抗体的其它杂交瘤。

[0290] 还可使用抗独特型技术来产生模拟表位的单克隆抗体。例如,针对第一单克隆抗体所制得的抗独特型单克隆抗体将在超变区中具有结合结构域,所述结合结构域是通过第一单克隆抗体结合的表位的镜像。因此,在这种情况下,抗独特型单克隆抗体可用于免疫来产生这些抗体。

[0291] 在本发明的一些方面中,以可检测方式或治疗方式标记抗体将有用。适宜标记阐述于以上参考文献中。将抗体偶联至这些试剂的方法已为本领域得知。仅出于阐释的目的,抗体可经可检测部分(例如放射性原子、发色团、荧光基团或诸如此类)标记。所述经标记抗体可在体内或在经分离测试样品中用于诊断技术。

[0292] 将抗体偶合至低分子量半抗原可增加抗体在分析中的敏感性。然后,半抗原可通过第二反应特异性检测。例如,通常使用可与特异性抗半抗原抗体反应的半抗原,例如与抗生物素蛋白反应的生物素、或二硝基苯酚、吡哆醛和萤光素。参见哈洛(Harlow)和莱恩(Lane)(1988)参考文献同上。

[0293] 抗体可经可检测部分(例如放射性原子、发色团、荧光基团或诸如此类)标记。所述经标记抗体可在体内或在经分离测试样品中用于诊断技术。抗体还可(例如)偶联至医药试剂(例如化学治疗药物或毒素)。其可连接至细胞因子、配体、另一抗体。适用于偶联至抗体以达成抗肿瘤作用的试剂包括细胞因子,例如白介素2(IL-2)和肿瘤坏死因子(TNF);光敏剂,其用于光动力疗法,其包括四磺酸基酞菁铝(III)、血卟啉、和酞菁;放射性核素,例如碘-131(¹³¹I)、钇-90(⁹⁰Y)、铋-212(²¹²Bi)、铋-213(²¹³Bi)、镅-99m(^{99m}Tc)、铼-186(¹⁸⁶Re)、和铼-188(¹⁸⁸Re);抗生素,例如多柔比星(doxorubicin)、亚德里亚霉素(adriamycin、柔红霉素(daunorubicin)、甲氨蝶呤、道诺霉素(daunomycin)、新制癌菌素

(neocarzinostatin)、和卡铂(carboplatin);细菌、植物、和其它毒素,例如白喉毒素、假单胞菌外毒素A、葡萄球菌肠毒素A、相思豆毒蛋白-A毒素、蓖麻毒素A(去糖基化蓖麻毒素A和原生蓖麻毒素A)、TGF- α 毒素、来自中华眼镜蛇(Chinese cobra)(眼镜蛇(naja naja atra))的细胞毒素、和白树毒素(植物毒素);来自植物、细菌和真菌的核糖体失活蛋白,例如局限曲菌素(由局限曲霉(*Aspergillus restrictus*)产生的核糖体失活蛋白)、皂草素(由石碱草(*Saponaria officinalis*)产生的核糖体失活蛋白)、和RNase;酪氨酸激酶抑制剂;ly207702(二氟化嘌呤核苷);含有反囊性剂(anti cysticagent)的脂质体(例如,反义寡核苷酸、编码毒素的质粒、甲氨蝶呤等);和其它抗体或抗体片段,例如F(ab)。

[0294] 本发明的抗体也可结合至许多不同载体。因此,本发明还提供含所述抗体和另一种活性或惰性物质的组合物。已知载体的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。载体的性质出于本发明的目的可为溶解或不溶解。所属领域的技术人员应已知用于结合单克隆抗体的其它适宜载体,或应能够使用常规试验确定所述载体。

[0295] V. 备选的解毒剂和本发明的方法

[0296] 预计加入SEQ ID NO.13多肽的单位剂量制剂对于解毒剂是有用和有效的。

[0297] 本发明的一个方面涉及防止或降低正经历抗凝血疗法的受试者出血的方法,所述方法通过向所述受试者施用有效量的因子Xa蛋白质衍生物实施。在一个实施例中,衍生物具有经修饰的活性位点和/或经修饰的Gla-结构域,由此具有降低的促凝血活性或没有促凝血活性。衍生物起到解毒剂的作用且实质上中和抑制剂的抗凝血活性。在一个实施例中,所述衍生物缺乏Gla或无Gla结构域。受试者可为哺乳动物或更具体来说人类。

[0298] 在另一实施例中,本发明涉及选择性结合并抑制受试者中外源施用的因子Xa抑制剂的方法。所述方法包含向患者施用有效量的如上文所述的因子Xa衍生物的衍生物。患者可为细胞或哺乳动物(例如人类)。

[0299] 适于此疗法的受试者之前已经历抗凝血疗法,例如,其已经施用一种或多种的抗凝血剂(例如因子Xa的抑制剂)。为因子Xa抑制剂的抗凝血剂实例包括(但不限于)磺达肝素、依达肝素、生物素化的依达肝素、依诺肝素、法安明(fragmin)、NAP-5、rNAPc2、组织因子途径抑制剂、DX-9065a、YM-60828、YM-150、阿哌沙班、利伐沙班、PD-348292、奥米沙班、依度沙班、LY517717、GSK913893、低分子量肝素、和贝曲西班、或其任一组合。在整个说明书中可找到各种抗凝血剂的来源。

[0300] 在一个方面中,所述衍生物具有经修饰的活性位点和/或经修饰或去除的Gla结构域。在一个方面中,所述因子Xa衍生物没有或不展示促凝血活性。在此方面中,衍生物至少包含SEQ ID NO.3的氨基酸残基40至448、45至448、或46至448或其等效物。在另一方面中,所述衍生物至少包含SEQ IDNO.3的氨基酸残基45至139和195至448或46至139和195-448或其等效物。

[0301] 在本发明的另一方面中,fXa衍生物保留fXa蛋白质活性位点的三维结构。关于去Gla的fXa的三维结构的信息可在布朗施泰特(Brandstetter,H)等人生物化学杂志(J.Bio.Chem.),1996,271:29988-29992中找到。

[0302] 在本发明的另一方面中,fXa衍生物可缺少Gla结构域以及两个EGF结构域中的任一者。在本发明的另一方面中,fXa衍生物完全缺少轻链。重链的其它修饰可包含能够结合

抑制剂的相关丝氨酸蛋白酶的催化结构域。相关丝氨酸蛋白酶所具有的催化结构域与fXa催化结构域具有足够结构相似性且因此能够结合小分子fXa抑制剂。相关丝氨酸蛋白酶的实例包括(但不限于)哺乳动物蛋白酶(例如血浆激肽释放酶、凝血酶和胰蛋白酶)或细菌蛋白酶枯草杆菌蛋白酶。这些衍生物进一步包括在等效于本文所述活性位点丝氨酸(SER379)或天冬氨酸(ASP282)残基的氨基酸残基处进行修饰。

[0303] 在一些实施例中,具有降低的促凝血活性的因子Xa蛋白质包含经修饰轻链,其中所述修饰是取代、添加或缺失Gla-结构域以降低fXa的磷脂膜结合。在一些实施例中,fXa的主要氨基酸序列并未改变,但某些氨基酸的侧链已经改变。降低fXa的磷脂膜结合的经修饰Gla-结构域的实例包含具有主要氨基酸序列SEQ ID NO.3或其等效物的多肽或蛋白质,其中与野生型人类因子Xa蛋白质的Gla-结构域相比有至少一个氨基酸取代、添加或缺失。在一些实施例中,至少一个取代或缺失的氨基酸是 γ -羧基谷氨酸(Gla)。Gla残基在SEQ ID NO.3中展示于氨基酸位置6、7、14、16、19、20、25、26、29、32、和39处。在一些实施例中,解毒剂的主要氨基酸序列与SEQ ID NO.3或其等效物一致,但是一种未羧化、羧化不全或脱羧的因子Xa蛋白质。在一些实施例中,所述解毒剂是去Gla的无水-fXa或去Gla的fX-S379A。在一些实施例中,具有降低的磷脂膜结合的因子Xa蛋白质进一步包含修饰或缺失EGF1和/或EGF2(如图3中分别作为氨基酸46至84和85至128所展示)或其部分(即,所述EGF1和/或EGF2结构域的片段)。在一些实施例中,整个轻链或实质上整个轻链经修饰或去除。例如,具有降低的磷脂膜结合的经修饰fXa蛋白质可仅含重链或所述经修饰的fXa可含有重链和轻链含Cys132(与SEQ ID NO.3中重链的Cys302形成单二硫键的氨基酸残基)的片段。在一些实施例中,所述衍生物包含氨基酸序列SEQ ID NO.10或SEQ ID NO.11。在一些实施例中,所述衍生物是包含SEQ ID NO.13的双链多肽。在其它实施例中,所述衍生物是SEQ ID NO.15的多肽。

[0304] 在一些实施例中,所述因子Xa蛋白质衍生物包含含所述因子Xa蛋白质的催化结构域的经修饰重链。在一些实施例中,至少一个氨基酸取代存在于选自由以下组成的群组的fXa的一个或多个的氨基酸位置处:SEQ ID NO.3和7中的Glu216、Glu218、Arg332、Arg347、Lys351、和Ser379(分别为胰凝乳蛋白酶编号中的Glu37、Glu39、Arg150、Arg165、Lys169、和Ser195)。在一些实施例中,所述解毒剂是具有活性位点丝氨酸(SEQ ID NO.3和7中的Ser379,胰凝乳蛋白酶编号中的Ser195)残基的因子Xa蛋白质,所述残基被修饰成脱氢丙氨酸或丙氨酸。可对野生型fXa蛋白质或对上述经修饰fXa蛋白质或片段中的任一者进行所述修饰。例如,活性位点丝氨酸残基被实施例1中所述的脱氢丙氨酸替代的去Gla的无水-fXa已展示解毒活性。

[0305] 在其它实施例中,与野生型或天然存在的因子Xa相比,衍生物与ATIII、辅因子fV/fVa和fVIII/fVIIIa的相互作用降低。在一些实施例中,在SEQ ID NO.3和7中的氨基酸位置Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414或Arg424(分别为胰凝乳蛋白酶编号中的Arg125、Glu129、Arg165、Lys169、Lys230或Arg240)处存在至少一个氨基酸取代。可对野生型fXa蛋白质或对上述经修饰fXa蛋白质或片段中的任一者进行所述修饰。

[0306] 在其它实施例中,所述解毒剂是包含可模拟fXa重链抑制剂结合能力的丝氨酸蛋白酶催化结构域的氨基酸序列的蛋白质。所述蛋白质可包括哺乳动物蛋白酶,例如血浆激肽释放酶、凝血酶、胰蛋白酶(或其细菌同系物枯草杆菌蛋白酶),所述蛋白酶已以重组方式

经修饰而缺少能够裂解蛋白质底物的丝氨酸蛋白酶活性,但仍具有活性位点裂缝的结构特征。

[0307] 本发明还提供医药组合物,其含有一种或多种的经修饰因子Xa衍生物和药学上可接受的载体。将组合物以将提供期望益处(即出血减少或停止)的量施用给需要的患者。所述组合物可与补充或增强因子Xa衍生物的活性的任何适宜试剂或疗法共同施用。所述实例是能够延长解毒剂的血浆半寿期的第二试剂。适宜第二试剂的实例包括(但不限于)识别fXa重链的外部位点的抗fXa抗体或 α -2-巨球蛋白结合fXa衍生物。fXa衍生物与第二试剂(外部位点抗体或 α -2-巨球蛋白)之间形成复合物将阻断大分子相互作用,但保留活性位点依赖性抑制剂结合能力。适于共同施用的抗fXa抗体的实例包括(但不限于)那些阐述于杨(Yang Y.H.)等人,免疫学杂志(J.Immunol.) 2006,1;177(11):8219-25、威尔肯斯(Wilkens,M)和克瑞斯内瓦米(Krishnaswamy,S.),生物化学杂志(J.Bio.Chem.),2002,277(11),9366-9374和丘奇(Church WR)等人,血液(Blood),1988,72(6),1911-1921。

[0308] 在一些实施例中,因子Xa蛋白质是通过化学的、酶的重组方式修饰的。例如,活性位点Ser379可以化学方式修饰成脱氢丙氨酸,且Gla结构域可通过胰凝乳蛋白酶消化以酶方式去除,如实施例1中所述。本文所述经修饰fXa也可通过重组方式通过修饰编码野生型fX的cDNA的序列(SEQ ID NO.2)(更详细阐述于实例7中)来直接表达重组解毒剂(r-解毒剂)来产生,或另一选择为,具有期望修饰的fX蛋白质可通过重组方式、随后通过活化剂(例如蛇毒,例如罗塞尔(Russell)的蝰蛇毒,和fVIIa/组织因子或fIXa/fVIIIa的复合物)活化成经修饰fXa来产生。

[0309] 将受益于本文所阐述组合物的施用和伴随方法的患者包括那些正经历、或易患临床重大出血事件或临床明显非重大出血事件者。临床重大出血事件的实例选自由以下组成的群组:出血、重要器官出血、需要再次手术或新的治疗程序的出血、和出血指数 ≥ 2.0 且伴有明显出血。(特派爱(Turpie AGG)等人,新英格兰医学杂志(NEJM),2001,344:619-625。)另外,受试者可正经历、或易患选自由以下组成的群组的非重大出血事件:持续性或复发性且大量或在无干预的情况下将不会停止的鼻出血、不会上升到需要治疗程序的水平的直肠或泌尿道出血、注射位点或其它地方自发性的或出现轻微创伤的大量血液流失、超过通常伴随不需要引流术的手术程序的大量血液流失、和需要非计划性输血的出血。

[0310] 在一些实施例中,解毒剂是在施用过剂量的fXa抑制剂之后或在可能将受试者暴露于出血风险的手术之前施用。

[0311] 在本文所述的任一方法中,应了解,即使并未明确陈述,也是将有效量的衍生物向患者施用。所述量可由治疗医师根据经验确定且将随患者的年龄、性别、重量和健康状况而变。治疗医师需要考虑的额外因素包括(但不限于)可能已经施用的因子Xa抑制剂的特性 和/或数量、解毒剂将向患者施用的方法或模式、解毒剂的制剂、和患者的治疗终点。利用这些考虑的变量,所属领域的技术人员将施用治疗有效量给欲治疗的患者。在再一方面中,本发明涉及用于逆转或中和向患者施用的因子Xa抑制剂的抗凝血活性的医药组合物,其包含将有效量的解毒剂施用因子Xa抑制剂和药学上可接受的载体中,前提条件是所述解毒剂不是血浆源性因子VIIa、重组因子VIIa、新鲜冷冻血浆、凝血酶原复合物浓缩物和全血。

[0312] 在一些实施例中,所述解毒剂是上述解毒剂中的任一者。在一些实施例中,所述解毒剂与能够延长解毒剂循环半寿期的部分偶联。在一些实施例中,所述部分选自由聚乙二

醇、酰基、脂质体、载体蛋白、人工磷脂膜、和纳米粒子组成的群组。例如,本文所述fXa衍生物的非活性位点赖氨酸或半胱氨酸残基可以化学方式修饰以附接至聚乙二醇分子。提供于沃勒(Werle,M.)和伯恩考普-斯诺池(Bernkop-Schnürch,A),提高肽和蛋白质药物的血浆半寿期时间的方法(Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs),氨基酸(Amino Acids)2006,30(4):351-367中的其它方法可用于延长本发明解毒剂的血浆半寿期。

[0313] 在本发明的其它实施例中,fXa衍生物的半寿期是通过使解毒剂偶合至Fc载体结构域来提高。在一个实施例中,解毒剂偶合至Fc片段,例如免疫球蛋白肽部分或IgG1片段。在一个实施例中,涵盖包含所述fXa衍生物和免疫球蛋白肽部分的嵌合蛋白质。在再一实施例中,fXa衍生物和免疫球蛋白肽是通过化学反应偶合,例如具有人类IgG重链和κ轻链恒定区的二硫键。

[0314] 在一些实施例中,所述医药组合物进一步包含能够延长解毒剂的血浆半寿期的试剂。在另一方面中,所述医药组合物已与能够延长解毒剂的血浆半寿期的试剂共同施用。在一些实施例中,共同施用或共同调配的试剂是识别fXa的外部位点的抗fXa抗体或结合fXa衍生物的α-2-巨球蛋白。

[0315] VI. 疗法

[0316] 本发明的一个方面涉及防止或降低正经历抗凝血疗法的受试者出血的治疗方法。预计本发明的解毒剂或衍生物可为在非急需或急诊情况中使用的短期药物,其可安全并特异性地中和fXa抑制剂的常规抗凝血性质而不会造成有害的血液动力学副作用或加重对损害的增殖血管反应。

[0317] 在一个实施例中,治疗有效量的解毒剂展示高治疗指数。治疗指数是毒性和治疗效果之间的剂量比,其可表示为LD₅₀与ED₅₀之间的比率。LD₅₀是对于50%的群体是致命的剂量且ED₅₀是在50%群体中治疗有效的剂量。LD₅₀和ED₅₀是通过标准制药程序在动物细胞培养物或实验动物中确定。本发明的解毒剂或衍生物可视需要施用一次或若干次以中和患者的血浆中所存在的fXa抑制剂的作用。优选地,本发明的解毒剂当以单剂量施用时即足够。

[0318] 预计本发明解毒剂的典型剂量将取决于实际临床环境和血浆中的抑制剂浓度。在体外分析(例如凝血酶生成)、临床凝血分析(例如aPTT、PT和ACT)中,期望治疗有效量的解毒剂以产生离体凝血活性的10%或更高的校正。体外分析表明,解毒剂/抑制剂比>1.0将展示逆转作用。预期解毒剂的最大血浆浓度在微摩尔范围内、大致在10微摩尔或更低之间。

[0319] 在临床环境中,确定解毒剂有效性的一个准则是其产生出血的实际测量的任何变化。在临床实验中,重大出血的类别包括致命性出血、重要器官出血(颅内、眼内、腹膜后、脊柱、心包)、需要再次手术或新的治疗程序的任何出血(例如,手术膝盖的抽吸、针对胸腔积血的开胸管插入、内窥镜下电凝等)或出血指数≥2.0,如果其伴有明显出血。出血指数定义为所输入红细胞或全血容积的单位数量加上出血发作之前的血红蛋白值减去出血稳定之后的血红蛋白值(以克/分升计)。

[0320] 在临床环境中用于解毒剂效能的另一准则是其降低临床明显非重大出血。出血的类型包括非重大但超过平常且值得在临床注意的出血,其持续性或复发性且大量或在无干预的情况下将不会停止的鼻出血;不会上升到需要治疗程序的水平的直肠或泌尿道出血(例如,新插入弗利氏导尿管(Foley catheter)或膀胱镜检查)、注射位点或其它地方自发

性的或出现轻微创伤的大量血液流失;大量血液流失;需要非计划性输血的出血。如本文所用,“大量血液流失”是指血液流失的量超过通常与外科手术相关的量。大量血液流失会导致肿胀,但由于其达不到引流的要求,因而进行保守管控。

[0321] 在一个实施例中,本发明的衍生物具有足够血浆循环半寿期用于实质上中和血浆中存在的fXa抑制剂。活化fXa在人类中基本上没有循环半寿期,这是因为其有效被ATIII、TFPI和其它血浆抑制剂抑制(福克斯(Fuchs,H.E.)和皮佐(Pizzo,S.V.),临床研究杂志(J.Clin.Invest.),1983,72:2041-2049)。非活性fXa已展示在人类中具有2-3个小时的循环半寿期。在狒狒模型中,活性位点被DEGR([5-(二甲基氨基)1-萘磺酰基]-谷氨酰基甘氨酸基精氨酸基氯甲基酮)阻断的fXa的半寿期为约10小时或2小时,如分别通过同位素或酶连接的免疫吸附分析所确定(泰勒(Taylor,F.B.)等人,血液(Blood),1991,78(2):364-368)。

[0322] 其可期望的将解毒剂fXa衍生物的半寿期延长至24-48小时。预计偶联或添加一个或多个的以下部分将增加解毒剂的血浆半寿期:

- [0323] a) 聚乙二醇;
- [0324] b) 酰基;
- [0325] c) 脂质体和囊封剂;
- [0326] d) 载体蛋白;
- [0327] e) 人工磷脂膜;
- [0328] f) 免疫球蛋白;和
- [0329] g) 纳米粒子。

[0330] 偶联位点可不限于特定链或残基,只要所述偶联不遮蔽解毒剂的抑制剂结合位点即可。本文所述的解毒剂可与以上所述的任一种或多于一种的化合物组合施用。

[0331] 通常,所施用抗体具有远比循环血液凝固蛋白长的半寿期。可使用由Gla-结构域缺陷的fXa和作为解毒剂结合至fXa的外部位点且具有延长的循环半寿期的抗体组成的复合物。fXa与靶向外部位点的抗体之间形成复合物可降低Gla-结构域缺陷的fXa与大分子底物和抑制剂(例如凝血酶原和抗凝血酶III)的相互作用,同时保留未扰动的活性位点裂缝,以便复合物可作为解毒剂结合活性位点定向小分子抑制剂。形成的 α -2-巨球蛋白-fXa复合物也可有用的作为fXa小分子抑制剂的解毒剂。

[0332] 解毒剂在逆转fXa抑制剂的抗凝血活性的效能以及促凝血活性可通过体外分析和动物模型由所属领域的技术人员确定。体外分析的实例是凝血酶生成、临床凝血分析(例如aPTT、PT和ACT)。本发明的解毒剂预期能够产生离体凝血活性的10%或更高的校正。可在(例如)啮齿类动物(例如小鼠)、狗和灵长目动物(例如猴子)中使用出血时间和/或血液流失的若干体内动物模型来测量效能。

[0333] VII. 试剂盒

[0334] 本发明进一步提供试剂盒或包。在一些实施例中,本发明的试剂盒包含:(a) 第一容器,其含有定期施用用于治疗血栓形成的fXa抑制剂;和(b) 第二容器,其含有本发明的欲在当(a)中的fXa抑制剂给药过量或当需要恢复正常止血以停止或防止出血时的情况下使用的解毒剂。在其它实施例中,试剂盒进一步包含解释(a)和(b)中的这两种试剂应何时使用的标签。

[0335] 所述第一和第二容器可为瓶子、罐、小瓶、细颈瓶、注射器、管、袋、或在制造、存储或分配医药茶品中所用的任何其它容器。包装说明书可为列举涉及试剂盒的医药组合物的信息的标记、标签、标志、或诸如此类。所列举的信息通常应由管理医药组合物销售领域的管理机构（例如美国食品和药物管理局（the United States Food and Drug Administration）确定。优选地，包装说明书特别地列举医药组合物已获得批准的标示。包装说明书可由可读取其中或其上所含有的信息的任何材料制得。优选地，包装说明书为可印刷材料，例如纸、粘合剂背衬纸板、箔、或塑料、和诸如此类，其上已印刷或施加所想要的信息。

实施例

[0336] 通过参考以下实例可进一步理解本发明，但所述实例仅意欲纯粹解释本发明。本发明的范围并不受例示性实施例限制，所述实施例仅意欲作为本发明单个方面的陈述。功能上等效的任何方法都在本发明的范围内。除那些本文所阐述的以外，根据上文阐述和附图的本发明的各种修改对于所属领域的技术人员将显而易见。所述修改均属于随附权利要求书的范围内。

[0337] 除非另有说明，否则所有温度皆以摄氏温度表示。而且，在这些实例及其它地方，缩写具有以下含义：

[0338]	aa	=	氨基酸
[0339]	ab	=	抗体
[0340]	ACT	=	活化凝血时间
[0341]	aPTT	=	活化部分促凝血酶原激酶时间
[0342]	CHO细胞	=	中国仓鼠卵巢细胞
[0343]	CHO dhfr (-) 细胞	=	缺少dhfr基因的CHO细胞
[0344]	hr	=	小时
[0345]	INR	=	国际标准化比例
[0346]	IV	=	静脉内
[0347]	kg	=	千克
[0348]	M	=	摩尔
[0349]	mg	=	毫克
[0350]	mg/kg	=	毫克/千克
[0351]	mg/mL	=	毫克/毫升
[0352]	min	=	分钟
[0353]	mL	=	毫升
[0354]	mM	=	毫摩尔
[0355]	nm	=	纳米
[0356]	nM	=	纳摩尔
[0357]	PO	=	经口
[0358]	PPP	=	贫血小板血浆
[0359]	PRP	=	富血小板血浆

[0360]	PT	=	凝血酶原时间
[0361]	RFU	=	相对荧光单位
[0362]	s	=	秒
[0363]	TF	=	组织因子
[0364]	U/mL	=	单位/毫升
[0365]	μL或uL	=	微升
[0366]	μM	=	微摩尔
[0367]	μg	=	微克

[0368] 实施例1. 通过胰凝乳蛋白酶消化制备去Gla的无水-fXa

[0369] 根据莫里塔 (Morita, T.) 等人, 生物化学杂志 (J. Bio. Chem.), 1986, 261 (9) : 4015-4023 的程序通过将无水-fXa (其中脱氢丙氨酸替代活性位点丝氨酸) 与胰凝乳蛋白酶于 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl 中于 pH 7.5 和 22°C 下一起培育 60 分钟来制备去Gla的无水-fXa。在典型实验设定中, 将 0.5 毫克/毫升 (mg/mL) 无水-fXa 与 5 单位/毫升 (U/mL) α-胰凝乳蛋白酶-琼脂糖珠粒一起在轻轻搅动下培育。反应结束时, 通过离心或过滤去除 α-胰凝乳蛋白酶-琼脂糖珠粒。此随后与过量抑制剂 4-脒基 (amidino)-苯基-甲烷-磺酰氟 (APMSF)、甲苯磺酰基-L-赖氨酸氯甲基酮 (TLCK)、和甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮 (TPCK) 一起培养以淬灭残余 fXa 活性或可能从珠粒浸出的任何胰凝乳蛋白酶活性。通过阿米可 (Amicon) 超离心过滤装置 (YM10 膜) 或通过常规透析从最终产物去Gla的无水-fXa 中去除 Gla-结构域片段和抑制剂。视需要还同时实施浓缩或缓冲剂交换。含 Gla-结构域的无水-fXa 是根据野上 (Nogami) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 1999, 274 (43) : 31000-7 中所报告的程序来制备。

[0370] 含 Gla 的无水-fXa 是根据野上 (Nogami) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 1999, 274 (43) : 31000-7 中所报告的程序来制备。如图 5 所示, 含 Gla 的无水-fXa 酶活被减少但能够结合如贝曲西班的 fXa 抑制剂。这在实施例 4 详细描述。

[0371] α-胰凝乳蛋白酶-琼脂糖珠粒是自西格玛 (Sigma) 购得且比活性 (U/mL) 是根据所用特定批号的制造商数据。

[0372] 活性 fXa 的胰凝乳蛋白酶消化可根据以上程序在不使用 APMSF 的情况下实施。在胰凝乳蛋白酶消化之前、和胰凝乳蛋白酶消化 15、30 和 60 分钟之后根据以下实施例 3 所阐述的程序确定活性 fXa 的凝血活性。图 7 展示胰凝乳蛋白酶消化 30 分钟之后完全丧失凝血活性。培育时间延长至 60 分钟以确保完全去除 Gla 结构域。

[0373] 实施例 2. 贫血小板血浆 (PPP) 或富血小板血浆 (PRP) 中的凝血酶生成分析

[0374] 在此实施例中, 人类贫血小板或富血小板血浆样品是从抽取到 0.32% 柠檬酸盐中的健康供者的血液制备。PRP 和 PPP 是通过在室温下将抗凝血血液分别以约 100X 重力或 1000X 重力旋转 20 分钟来制备。将 75-100 微升 (uL) 血浆与 CaCl₂ 和 Z-Gly-Gly-Arg-氨基甲基香豆素 (Z-GGR-AMC, 凝血酶产荧光底物) 混合。添加组织因子 (伊诺文 (Innovin), 德灵公司 (Dade Behring)) 来开始凝血酶的生成。对于典型实验来说, 反应混合物含有 15 毫摩尔 (mM) Ca²⁺、100 微摩尔 (μM) Z-GGR-AMC、和 0.1 纳摩尔 (nM) 组织因子 (TF) (伊诺文 (Innovin))。在 37°C 下通过测量相对荧光单位 (RFU) 的荧光板读取器 (分子装置 (Molecular Devices)) 连续监测凝血酶形成。当存在时, 将抑制剂和解毒剂与血浆一起于室温下预培育 20 分钟, 然后开

始凝血酶生成。

[0375] 使用此分析的各个实验的结果可在图4、6和9中找到。

[0376] 实施例3.凝血延长分析

[0377] 使用两个凝血分析格式来测试因子Xa抑制剂和解毒剂对凝血延长的作用。在第一格式中,使用96孔板来同时测量多个样品。在第二分析格式中,利用常规凝血仪器(麦拉伊莱克特拉(MLA Electra) 800自动凝血计时器)测量aPTT。

[0378] 在所述96孔板格式方法中,以类似于实施例2中的程序制备人类贫血小板血浆或富血小板血浆。将75-100uL血浆利用CaCl₂再钙化,于37℃下培育3分钟并通过添加组织因子(伊诺文(Innovin),德灵公司(Dade Behring))或aPTT试剂(安克停(Actin)FS,德灵公司(Dade Behring))开始血凝块形成。通过板读取器(分子装置(Molecular Devices))连续监测OD405的变化。凝血时间定义为当达到吸光度(OD405nm)变化的半最大值时的时间(秒)。当存在时,将因子Xa抑制剂和解毒剂与血浆一起于室温下预培育20分钟,然后开始反应。

[0379] 当测试活性fXa的凝血活性时(如图7中所示),将75-100uL fX缺乏血浆(乔治国王生物医学公司(George King Bio-Medical, Inc.))利用CaCl₂再钙化,于37℃下培育3分钟并将胰凝乳蛋白酶消化后的fXa产物添加于血浆中以开始血凝块形成。如上所述通过板读取器连续监测OD405的变化。

[0380] 在图13中,利用麦拉伊莱克特拉(MLA Electra) 800自动凝血计时器测量400nM贝曲西班对正常人类血浆的aPTT延长的作用和贝曲西班抑制作用被解毒剂去Gla的无水-fXa的逆转。将100uL汇集的人类血浆与400nM贝曲西班和不同浓度的解毒剂混合。根据制造商的凝血时间测量说明书添加aPTT试剂(安克停(Actin)FS,德灵公司(Dade Behring))和CaCl₂。

[0381] 使用此分析的额外实验的结果可在图10和11中找到。

[0382] 实施例4.由无水-fXa或去Gla的无水-fXa逆转贝曲西班对fXa的抑制

[0383] 为测量贝曲西班对fXa活性的抑制和其抑制作用的逆转,将经纯化活性fXa、不同浓度的贝曲西班和无水-fXa或去Gla的无水-fXa添加到20mM Tris、150mM NaCl、5mM Ca²⁺、和0.1%牛血清白蛋白(BSA)。于室温下培育20分钟之后,将100uM斯柏克则米-fXa(Spectrozyme-fXa)(一种因子Xa发色底物,考汝莫詹尼斯(Chromogenix))添加到混合物中并通过板读取器在405纳米(nm)下连续5分钟监测底物切割速率。在图5中,将发色活性标准化成在不存在任何抑制剂情况下的活性fXa。产物形成的初始速度作为抑制剂和解毒剂浓度的函数通过非线性回归以估计贝曲西班对解毒剂的亲和力来分析(图8)。

[0384] 在有或没有阿加曲班(一种特异性小分子IIa抑制剂)的情况下以类似于先前的方式测量解毒剂去Gla的无水-fXa对针对发色底物S2288(200uM)的凝血酶活性的作用。如所预计,解毒剂(538nM)并不影响IIa(5nM)的酰胺分解活性或50nM阿加曲班对其的抑制作用。

[0385] 实施例5.制备具有脱羧γ-羧基谷氨酸残基的fXa

[0386] 具有脱羧γ-羧基谷氨酸残基的fXa衍生物可通过(例如)根据巴贾吉(Bajaj)等人生物化学杂志(J. Biol. Chem.), 1982, 257 (7): 3726-3731中所报告的程序处理fXa蛋白质来制备。将存于2mL 0.1摩尔碳酸氢铵(pH 8.0)中的2至5mg纯化或重组fXa冻干。将所得粉末于小于20um的真空下密封并在110℃下加热不同时期以获得脱羧fXa。

[0387] 实施例6.重组去Gla的fXa-S379A的制备

[0388] fXa衍生物可通过重组DNA方法利用以下基于表达fX (SEQ ID NO.1、3) 或fXa衍生物 (SEQ ID NO.4、5、9、和11) 的fXcDNA (SEQ ID NO.2) 的程序中的任一者在适宜宿主有机体中根据诱变和分子生物学中的一般程序来产生。

[0389] 重组fX和fX衍生物可基于拉森 (Larson, P.J.) 等人, 生物化学 (Biochem.), 1998, 37:5029-5038和卡米雷 (Camire, R.M.) 等人, 生物化学 (Biochem.), 2000, 39, 14322-14329中所阐述的程序表达于 (例如) 人类胚肾细胞HEK293中。重组fX可通过因子X活化剂罗塞尔 (Russell) 的蝰蛇毒 (RVV) 活化成rfXa。rfXa可根据实施例1中所阐述的程序进一步处理成去G1a的无水-fXa。

[0390] 活性位点丝氨酸残基已由丙氨酸替代的重组fX-S379A (胰凝乳蛋白酶编号中的S195A)、且优选经活化fXa突变体rfXa-S379A可根据辛哈 (Sinha) 等人, 蛋白质表达和纯化 (Protein Expression and Purif.) 1992, 3:518-524; 沃尔夫 (Wolf, D.L.) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1991, 266 (21): 13726-13730所阐述的程序表达于 (例如) 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中。

[0391] 去G1a的fXa-S379A可根据实施例1中所阐述的程序通过胰凝乳蛋白酶消化fXa-S379A来制备。

[0392] 更优选地, 去G1a的fXa-S379A可直接根据先前程序来表达, 其中G1a-结构域片段的缺失是通过诱变程序。例如, 可使用重组蛋白质表达来表达: 去除SEQ ID NO.3的G1a-结构域片段1-39之后的去G1a (1-39) -fXa-S379A; 去G1a (1-44) -fXa-S379A, 其等效于脱氢丙氨酸被丙氨酸替代的SEQ ID NO.10; 和整个G1a-结构域被去除的去G1a (1-45) -fXa-S379A (SEQ ID NO.11)。

[0393] 也可在EGF1或EGF1加EGF2结构域 (图2) 处进一步截断以表达去 (1-84) -fXa-S379A或去 (1-128) -fXa-S379A衍生物。

[0394] 实施例7. 重组fXa突变体在CHO细胞中的表达

[0395] 此实施例阐述指导表达无G1a结构域的fXa-S379A (胰凝乳蛋白酶编号中的S195A) 变体的重组蛋白质表达构建体和细胞系。重组解毒剂不需要产生pd-解毒剂所需的活化或化学修饰步骤且在本文所讨论的体外分析中对血浆源性蛋白质具有相当的亲和力。

[0396] 在此实施例中, 将fXa突变体 (SEQ ID NO.13、表25) 直接表达于CHO细胞中 (参见表达载体的图14) 并如下文所述从条件培养基中纯化功能蛋白质。在体外和动物模型中测试重组解毒剂 (r-解毒剂) 功能活性 (实施例8)。

[0397] 使用PCR来使fX的cDNA序列 (SEQ ID NO.2) 在三个区中突变。第一突变是FX的G1a-结构域中缺失6-39aa (SEQ ID NO.3、图3)。第二突变是激活肽序列143-194aa由RKR (SEQ ID NO.16) 替代。此产生连接轻链和重链的RKRRKR (SEQ ID NO.17) 接头。分泌时, 此接头在CHO中去除而获得双链fXa分子。第三突变是活性位点残基S379突变成Ala残基。

[0398] 将刚刚阐述的cDNA (SEQ ID NO.16) 所产生的多肽阐述于表24 (SEQ ID NO.12) 中。cDNA与多肽的比对展示于表29中。分泌后所产生的双链fXa分子是表26中所阐述的轻链片段 (SEQ ID NO.14) 和表27中所阐述的重链片段 (SEQ ID NO.15)。

[0399] fX序列中的前1-5aa被保留并用于将fXa突变体的多肽连接至fX的prepro肽 (SEQ ID NO.1、图1), 以确保fXa突变体中prepro肽经适当处理。

[0400] 测序编码以上所述fXa突变体的多肽的DNA序列并插入图14中所示的表达载体。表

达载体的多核苷酸展示于SEQ ID NO.18中。将质粒DNA线性化并转染于CHOdhfr(-)细胞中。使用四氢叶酸酯(HT)缺乏的培养基加甲氨蝶呤(MTX)来选择细胞。使用fXELISA试剂盒(酶研究实验室(Enzyme Research Laboratories),目录编号FX-EIA)来针对高蛋白质表达筛选稳定克隆。将FXa突变体蛋白质表达于无血清培养基中并收获条件培养基并处理进行纯化。

[0401] 条件培养基中的靶蛋白质可通过离子交换层析分离并随后通过单步骤亲和层析(例如偶合至矩阵的抗fXa抗体)或通过若干层析步骤的组合(例如疏水和排阻矩阵)来纯化。亲和纯化可包括选择性结合至fXa活性位点裂缝的层析用物质,例如苯甲脒-琼脂糖或大豆胰蛋白酶抑制剂-琼脂糖(STI-琼脂糖)。

[0402] 图15A展示亲和(STI-琼脂糖,西格玛(Sigma)目录#T0637)纯化的fXa突变体分别使用识别fX重链和轻链的单克隆抗体(酶研究实验室(Enzyme Research Laboratories),FX-EIA)的Western印迹。当将连接轻链和重链的二硫键还原时,r-解毒剂在Western印迹中展示具有(类似于血浆源性fXa的)预期迁移率的重链带。与血浆中衍生的fXa相比,fXa突变体的Gla-结构域中第6-39号氨基酸残基的缺失导致r-解毒剂的轻链较低的分子量带。在印迹上也可以看到分子量标志物的位置。

[0403] 图15B和15C展示离子交换和亲和纯化接着使用Superdex 7510/300GL柱(GE医疗保健(GE Healthcare),目录#17-5174-01)大小排阻层析纯化的r-解毒剂的SDS-PAGE和Western印迹。

[0404] 实施例8. 体内小鼠模型

[0405] 测试在雄性C57B 1/6小鼠之内在施用或未施用解毒剂的情况下贝曲西班的药物代谢动力学和药物效应动力学(PK-PD)曲线。对于对照组以0、15、25、和75mg/kg剂量单次经口施用贝曲西班。15mg/kg用于解毒剂治疗组。解毒剂(300ug/200uL)或运载体(生理盐水,200uL)的单次静脉内(IV)注射是在1.5小时时间点之前的5分钟施用。

[0406] 在经口施用贝曲西班后1.5、2.0、和4.0小时,将小鼠用氯胺酮混合物(SC)麻醉并通过心脏穿刺抽血。获得存于50uL柠檬酸三钠中的血液样品(0.5mL)。全血INR是使用黑墨晁恩初级柱(HemoChron Jr. cartridges)(国际泰克尼达恩公司(International Technidyne Corporation))根据制造商的说明书来测量。通过离心制备小鼠贫血小板血浆用于贝曲西班和解毒剂(ELISA)血浆浓度确定。

[0407] 对于重组解毒剂(r-解毒剂)实验,对照组的小鼠以0、15、25、和75mg/kg经口给药贝曲西班。15mg/kg用于解毒剂(300ug/200mL)治疗组。经口施用贝曲西班后1.5小时(解毒剂注射后5分钟)取样品。

[0408] 如图16和17及表1和2中所示,施用贝曲西班(15mg/kg、PO)后对小鼠单次注射(300ug, IV)血浆源性解毒剂(pd-解毒剂)或重组fXa突变体(r-解毒剂)有效捕获体内的抑制剂。全血INR的PK-PD相关性和解毒剂血浆浓度(表1和2)表明,根据INR测量值功能性贝曲西班减少>50%,且证明fXa抑制剂被解毒剂经由多次注射或其它方案有效的中和。预计这些结果证明,本发明的fXa衍生物具有作为通用解毒剂以逆转具有出血或其它医疗急诊的患者中fXa抑制剂的抗凝血作用的可能。

[0409] 表1-在经口施用15mg/kg贝曲西班后1.5小时(解毒剂注射后5分钟)时在pd-解毒剂治疗的小鼠中的PK-PD相关性

[0410]

pd-解毒剂治疗的动物	1	2	3	4	5	6	7	平均
贝曲西班 (ng/mL)	673	793	1170	415	217	664	879	687
预计INR	4.2	4.5	5.2	3.3	2.3	4.1	4.7	4.0
测量INR	2.3	2.3	3.3	0.8	0.8	1.5	2.0	1.9
%校正	63.9	66.6	52.3	100	100	83.1	74.4	77.2

[0411] 表2-在经口施用15mg/kg贝曲西班后1.5小时(解毒剂注射后5分钟)时在r-解毒剂治疗的小鼠中的PK-PD相关性

[0412]

r-解毒剂治疗的动物	1	2	3	4	平均
贝曲西班 (ng/mL)	434	262	335	494	381
预计INR	3.2	2.5	2.8	3.5	3.0
测量INR	2.0	0.9	1.2	0.9	1.3
%校正	50.0	94.1	80.0	93.6	77.3

[0413] 图22展示在经口施用贝曲西班(15mg/kg)之后单次静脉注射(1次注射)或两次注射(2次注射)r-解毒剂的小鼠实验(n=5/组,312ug/200ul r-解毒剂)。对于单次注射组,在经口施用贝曲西班后1小时取小鼠血液样品。在1小时时间点前的5分钟施用运载体(对照_1)或r-解毒剂(1次注射)。对于双次注射组,在经口施用贝曲西班后55分钟时注射运载体或r-解毒剂并在115分钟时再注射一次。对于运载体(对照_2)和r-解毒剂(2次注射)治疗的小鼠在2小时时取小鼠血液样品。单次或双次注射解毒剂之后,所测量INR作为小鼠血浆中解毒剂/贝曲西班比例的函数展示于图22B中。

[0414] 实施例9.由解毒剂体外逆转利伐沙班和阿哌沙班

[0415] 如所预计,本发明所涵盖的解毒剂也能够结合并中和其它活性位点定向fXa抑制剂。表3和4展示pd-解毒剂和r-解毒剂对贝曲西班、利伐沙班和阿哌沙班的抑制作用的体外校正。将经纯化fXa(3.0nM)、抑制剂(7.5nM)、和不同浓度的解毒剂在具有20mM Tris、150mM NaCl、0.1%BSA且pH 7.4的缓冲液中于22℃下培育10分钟。经分析fXa活性类似于实施例4。

[0416] 表3-fXa抑制剂的抑制作用的%校正

[0417]

pd-解毒剂 (nM)	贝曲西班	利伐沙班	阿哌沙班
0	0	0	0
10.2	13.1	10.6	6.5
20.4	34.8	37.4	11.4
40.7	47.1	46.8	15.0
61.1	68.4	55.7	40.3
101.8	67.5	69.4	52.3
162.9	80.5	74.0	56.0
203.7	82.6	72.6	60.2

[0418] 表4-fXa抑制剂的抑制作用的%校正

[0419]

r-解毒剂 (nM)	贝曲西班	利伐沙班	阿哌沙班
------------	------	------	------

0	0	0	0
9.3	21.5	23.2	13.3
18.6	52.7	54.2	33.5
37.2	75.5	72.6	49.9
55.8	86.5	79.9	59.2
93.1	94.9	89.1	64.4
148.9	99.3	96.7	74.8
186.1	99.5	94.8	72.6

[0420] 如表3中所示,204nM pd-解毒剂对所测试抑制剂的抑制作用产生至少60%校正,而在表4中通过r-解毒剂(186nM)对于贝曲西班和利伐沙班达成>95%的抑制作用校正,和>70%的阿哌沙班逆转。

[0421] 实施例10.通过r-解毒剂体外逆转贝曲西班

[0422] 在表5中,在人类血浆凝血分析中测试重组解毒剂蛋白质对逆转贝曲西班的抗凝血的作用。通过麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra) 800自动凝血计时器测量300nM和400nM贝曲西班对血浆的aPTT延长和抑制作用的逆转的作用。将100uL汇集的柠檬酸盐抗凝血人类血浆与300nM或400nM贝曲西班和不同浓度的解毒剂混合。根据制造商说明书添加aPTT试剂(安克停 (Actin) FS, 德灵公司 (Dade Behring)) 和CaCl₂。

[0423] 表5-贝曲西班的抗凝血活性的r-解毒剂逆转

[0424]

	aPTT (秒)	倍数 变化	抗凝血作用 的%校正
对照人类血浆	35.2	1.00	-
300 nM 贝曲西班	61.8	1.76	-
300 nM 贝曲西班 + 570 nM r-解毒剂	38.3	1.09	88
300 nM 贝曲西班 + 760 nM r-解毒剂	38.2	1.09	88
300 nM 贝曲西班 + 1140 nM r-解毒剂	38.1	1.08	90
400 nM 贝曲西班	66.3	1.88	-
400 nM 贝曲西班 + 380 nM r 解毒剂	47.1	1.34	61
400 nM 贝曲西班 + 570 nM r-解毒剂	39.9	1.13	85
400 nM 贝曲西班 + 760 nM r-解毒剂	39.9	1.13	85
400 nM 贝曲西班 + 1140 nM r-解毒剂	37.8	1.07	92
400 nM 贝曲西班 + 1520 nM r-解毒剂	39.4	1.12	86
1140 nM r 解毒剂	38.9	1.11	-
1520 nM r 解毒剂	38.8	1.10	-

[0425] 实施例11. r-解毒剂体外逆转低分子量肝素 (“LMWH”)

[0426] 在图18中,通过人类血浆的浊度变化测试r-解毒剂逆转LMWH依诺肝素(赛诺菲-安万特(Sanofi-Aventis))的抑制作用的作用。将依诺肝素(0-1.25U/mL)于22℃下在有508nM r-解毒剂或没有r-解毒剂的情况下培育20分钟。根据实施例3中所阐述的程序测量浊度变化。508nM r-解毒剂实质上校正(>75%)0.3125-1.25U/mL依诺肝素的抑制作用。

[0427] 在图19中,在人类血浆凝血分析中测试r-解毒剂对逆转低分子量肝素(LMWH依诺肝素,赛诺菲-安万特(Sanofi-Aventis))的抗凝血的作用。通过麦拉伊莱克特拉(MLA Electra) 800自动凝血计时器测量1个抗Xa单位/mL LMWH对血浆的aPTT延长的作用和抑制作用的逆转。将100μL汇集的柠檬酸盐抗凝血人类血浆与依诺肝素和不同浓度的解毒剂混合。测量凝血时间之间,根据制造商说明书添加aPTT试剂(阿克停(Actin) FS,德灵公司(Dade Behring))和CaCl₂。添加1.14μM重组解毒剂对1个单位/mL依诺肝素产生的抗凝血作用产生52%校正。

[0428] 实施例12. r-解毒剂的体外逆转利伐沙班

[0429] 在图20中,在人类血浆凝血分析中测试重组解毒剂蛋白质对逆转小分子因子Xa抑制剂(利伐沙班,贝(Bay) 59-7939)的抗凝血的作用。如由佩尔茨博恩(Perzborn)等人,血栓形成和止血杂志(J. Thromb. Haemost.) 3:514-521, 2005所报告,凝血酶原时间测量是用于评价利伐沙班抗凝血作用的精确方法。通过麦拉伊莱克特拉(MLA Electra) 800自动凝血计

时器测量1uM利伐沙班对汇集的人类血浆的凝血酶原时间 (PT) 延长的作用和抑制作用的逆转。将100uL汇集的柠檬酸盐抗凝血人类血浆与利伐沙班和不同浓度的解毒剂混合。测量凝血时间之前, 根据制造商说明书将兔脑促凝血酶原激酶C PLUS试剂(德灵公司 (Dade Behring)) 添加到血浆样品中。添加1.9uM重组解毒剂对1uM利伐沙班所产生的抗凝血作用产生100%校正。

[0430] 实施例13.r-解毒剂体外逆转阿哌沙班

[0431] 在表6中, 在人类血浆凝血分析中测试重组解毒剂蛋白质对逆转阿哌沙班的抗凝血的作用。如皮恩涛 (Pinto) 等人, 医药化学杂志 (J. Med. Chem) .55 (22) :5339-5356, 2007所报告; 凝血酶原时间 (PT) 测量是用于评价阿哌沙班的离体抗凝血作用的精确方法。通过麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra) 800自动凝血计时器测量1uM和1.5uM阿哌沙班对汇集的人类血浆的凝血酶原时间 (PT) 延长的作用和抑制作用的逆转。将100uL汇集的柠檬酸盐抗凝血人类血浆与阿哌沙班和不同浓度的解毒剂混合。测量凝血时间之前, 根据制造商说明书将兔脑促凝血酶原激酶C PLUS试剂(德灵公司 (Dade Behring)) 添加到血浆样品中。添加1.9uM重组解毒剂对1.5uM阿哌沙班所产生的抗凝血作用产生97%校正。

[0432] 表6-阿哌沙班抗凝血活性的r-解毒剂逆转

[0433]

	PT (秒)	倍数变化
对照人类血浆	14.1	—
1μM阿哌沙班	16.4	1.16
1μM阿哌沙班+380nM r-解毒剂	15.3	1.09
1μM阿哌沙班+760nM r-解毒剂	14.9	1.06
1μM阿哌沙班+1.14μM r-解毒剂	14.2	1.01
1μM阿哌沙班+1.52μM r-解毒剂	14.2	1.01
1.5μM阿哌沙班	18.4	1.31
1.5μM阿哌沙班+1.52μM r-解毒剂	14.6	1.04
1.5μM阿哌沙班+1.90μM r-解毒剂	14.3	1.01
1.52μM r-解毒剂	14	—
1.90μM r-解毒剂	14.2	—

[0434] 实施例14. 去G1a的无水-fXa体外抑制阿加曲班

[0435] 为测量阿加曲班的凝血酶活性的抑制和其抑制作用的逆转, 将经纯化人类凝血酶 (5nM)、阿加曲班 (50nM) 和不同浓度的解毒剂去G1a的无水fXa添加至含20mM Tris、0.15M NaCl、5mM氯化钙、0.1%牛血清白蛋白的缓冲液 (pH 7.4) 中。于室温下培育20分钟之后, 将酰胺分解底物S2288 (200uM) 添加于混合物中并通过405nm下的吸光度监测对-硝基苯胺 (p-nitroanilide) 底物的切割速率。结果呈现于图12中。

[0436] 实施例15.r-解毒剂对直接fXa抑制剂活性的逆转

[0437] 为了测量小分子fXa抑制剂对fXa活性的抑制和其抑制作用的逆转, 将经纯化活性人血浆来源fXa (3nM)、不同浓度抑制剂 (0、2.5、5.0、7.5nM) 和r-解毒剂 (0-125nM) 在96孔板添加入具有20mM Tris、150mM NaCl、5mM Ca^{2+} 和0.1%牛血清蛋白 (BSA) 的缓冲液。于室温下培育20分钟后, 将100uM斯柏克则米-fXa (Spectrozyme-fXa) (一种因子Xa发色底物, 美国诊

断公司(American Diagnostica))添加到混合物中并通过板读取器在405纳米(nm)下连续5分钟监测底物切割速率。检测在总体积200uL下进行。底物切割的初始速度作为抑制剂和解毒剂浓度的函数是通过非线性回归以估计解毒剂对抑制剂的亲和力来分析。使用Dynafit软件进行数据分析。

[0438] 图23展示r-解毒剂对利伐沙班(A)、贝曲西班(B)和阿哌沙班(C)对fXa活性的抑制作用的逆转。使用如表7所示的估计的r-解毒剂亲和力(Kd)和报告的每种抑制剂的人血浆fXa的Ki画出曲线拟合。以下参考文献报告了抑制常数(Ki):利伐沙班(Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer KH, Straub A. J Thromb Haemost. 2005 Mar; 3 (3): 514-21); 贝曲西班(Sinha U, Edwards ST, Wong PW, et al. Antithrombotic activity of PRT54021, a potent oral direct factor Xa inhibitor, can be monitored using a novel prothrombinase inhibition bioassay. Blood 2006; 108: Abstract 907), 和阿哌沙班(Pinto DJ, Orwat MJ, Koch S, Rossi KA, Alexander RS, Smallwood A, Wong PC, Rendina AR, Luetzgen JM, Knabb RM, He K, Xin B, Wexler RR, Lam PY. J Med Chem. 2007 Nov 1; 50 (22): 5339-56. Epub 2007 Oct 3)。

[0439] 图23和表7所示结果表明r-解毒剂能够以高亲和力结合这些直接fXa抑制剂并能够剂量依赖地逆转它们对人fXa的抑制作用。

[0440] 表7. r-解毒剂对小分子fXa抑制剂的估计亲和力

[0441]

抑制剂	Ki, Xa (nM) *	Kd, r-解毒剂 (nM)
利伐沙班	0.4	3.3
贝曲西班	0.1	0.7
阿哌沙班	0.1	1.1

[0442] *文献报道的抑制常数

[0443] 实施例16. r-解毒剂对直接fXa抑制剂体外抗凝血活性的逆转

[0444] 利伐沙班(Xarelto™, BAY 59-7939)是一种预防正进行矫形手术的患者静脉血栓的直接fXa抑制剂。如Perzbornd等人, J. Thromb. Haemost. 3: 514-521, 2005所报告的, 凝血酶原时间(PT)测量是一种评估利伐沙班抗凝血效果的准确方法。利伐沙班的临床有效剂量产生最高血浆浓度高达318ng/ml (730nM, Kubitza et al, Eur. J. Clin. Pharmacol. 61: 873-880, 2005)。为了模拟超治疗浓度的抗凝血效应, 在临床大出血情况可能牵涉的水平, 检测了利伐沙班高于730nM的逆转浓度的可行性。

[0445] 使用麦拉伊莱克特拉(MLA Electra) 800自动凝血计时器测量1uM利伐沙班对汇集的人类血浆(按照Sinha U, Lin PH, Edwards ST, Wong PW, Zhu B, Scarborough RM, Su T, Jia ZJ, Song Y, Zhang P, Clizbe L, Park G, Reed A, Hollenbach SJ, Malinowski J, Arfsten AE. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Jun 1; 23 (6): 1098-104. Epub 2003 May 15的报道制备)凝血酶原时间(PT)延长的影响。实验中使用八名健康志愿者供体的组合柠檬酸抗凝血浆。为了测量凝血时间, 根据制造商说明书在血浆样品(100uL)中添加兔脑凝血C Plus试剂(德灵公司(Dade Behring))。

[0446] 如图24所示, 由于添加1uM利伐沙班基线PT(14.1秒)延长到23.4秒。利伐沙班的抗凝血效果是剂量依赖地并为r-解毒剂添加完全逆转, 而仅添加1.9uM r-解毒剂没有在PT

(14.2秒)上产生明显影响。

[0447] 阿哌沙班(BMS-562247)是一种直接fXa抑制剂,对其测试对房颤患者发生血栓栓塞事件的预防和正进行矫形手术的患者静脉血栓的预防((Lassen MR,Davidson BL, Gallus A,Pineo G,Ansell J,Deitchman D.J Thromb Haemost.2007Dec;5(12):2368-75.Epub 2007Sep 15)。如Luettgen等,Blood 108(11)Abstract 4130,2006报道的,PT测量是一种评估阿哌沙班抗凝血效果的准确方法。

[0448] 图25展示阿哌沙班的PT延长和添加r-解毒剂对其作用的逆转。

[0449] 实施例17.r-解毒剂对间接fXa抑制剂抑制的逆转

[0450] 使用浊度分析测试fXa抑制剂和r-解毒剂对延长凝血时间的作用。在这一格式中,使用96孔板同时测量多个样品。以类似于实施例2中的程序制备人类贫血小板血浆。将75-100uL血浆利用CaCl₂再钙化,于37℃下培育3分钟并通过添加组织因子(伊诺文(Innovin),德灵公司(Dade Behring))或活化的部分促凝血酶原激酶时间试剂(aPTT,安克停(Actin)FS,德灵公司(Dade Behring))开始血凝块形成。通过板读取器(分子装置(MolecularDevices))连续监测OD405的变化。凝血时间定义为当达到吸光度(OD405nm)变化的半最大值时的时间(秒)。当存在时,将FXa抑制剂(低分子量肝素,如依诺肝素,安万特制药(Aventis Pharma))和r-解毒剂与血浆一起于室温下预培育20分钟,然后开始反应。

[0451] 图26展示当人类贫血小板血浆添加1U/ml低分子量肝素(依诺肝素,Lovenox),然后添加不同量r-解毒剂时凝血参数(倍数)的变化。当添加aPTT试剂后测量浊度变化,与对照血浆相比,1U/ml依诺肝素产生高达5倍的凝血时间延长。急性冠状动脉综合征患者的依诺肝素处方剂量(1mg/kg皮下注射)对应约1U/ml。这一药代动力学标志物(抗-fXa单位)特别为LMWHs开发并与临床有效性和安全相关(Montalescot G, Collet JP,Tanguy ML, Ankri A,Payot L,Dumaine R,Choussat R,Beygui F,Gallois V, Thomas D.Circulation.2004Jul 27;110(4):392-8.Epub 2004Jul 12)。为了模拟当由于紧急手术患者的抗凝血状态需要被逆转时可能涉及的抗凝血效果,我们测试了逆转治疗浓度依诺肝素的可能性。如图26所示,r-解毒剂剂量依赖地逆转依诺肝素(1 fXa单位/ml)的抗凝血效果,其中在添加4uM r-解毒剂时获得了aPTT的接近完全校正。

[0452] 实施例18.大鼠静脉给药r-解毒剂对利伐沙班诱导的抗凝血的逆转

[0453] 大鼠腹膜内使用氯胺酮混合物(ketamine cocktail)麻醉,迅速插管为颈静脉施用利伐沙班和解毒剂并安置第二导管以从股静脉进行系列采血。通过在样本间灌注生理盐水使采血导管保持通畅。大鼠以0.25mg/kg/hr IV或运载体(水中的50%聚乙二醇)施用利伐沙班30分钟(5.24mL/kg/hr)。在30分钟,利伐沙班输注停止并在5分钟内以1.0或3.4mg IV推注(2ml)施用r-解毒剂。为0、30(在利伐沙班输注结束前)、35(推注治疗施用结束)、60、90和120分钟的全血INR、利伐沙班血浆浓度和解毒剂浓度测量获得用3.2%柠檬酸钠(1:10稀释)抗凝的系列血液样本。在Hemochron Jr上使用柠檬酸PT盒确定全血INR和PT测量值。全血INR和PT用于监测华法令(warfarin)抗凝下的患者和作为评价抗凝程度的验证方法被报告。使用高效液相层析与串联质谱分析血浆样本利伐沙班浓度。采用加权最小二乘回归分析产生校准标准曲线进行定量。如实施例23所述以ELISA确定r-解毒剂浓度。图27展示利伐沙班接着r-解毒剂施用的效果的剂量响应逆转。使用即时凝血分析(a point of care clotting assay)(全血INR)定量给药大鼠的抗凝状态。按斯氏T检验(未配对双尾),利伐沙

班处理组和r-解毒剂给药组间全血INR的差异是统计学上显著的 ($p \leq 0.004$ 对应1mg剂量和 $p \leq 0.001$ 对应3.4mg剂量)。

[0454] 实施例19. 在r-解毒剂给药时对利伐沙班未结合血浆浓度降低的测量

[0455] 大鼠腹膜内施用氯胺酮混合物麻醉, 迅速插管为颈静脉施用利伐沙班和解毒剂并安置第二导管以从股静脉进行连续采血。通过在样本间缓慢灌注生理盐水来保持采血导管保持通畅。大鼠以0.25mg/kg/hr IV或运载体(水中50%的聚乙二醇)施用利伐沙班30分钟(5.24mL/kg/hr)。在30分钟, 利伐沙班输注停止并在5分钟内以1.0或3.4mg IV推注(2ml)施用r-解毒剂。为0、30(在利伐沙班输注结束前)、35(推注治疗施用结束)、60、90和120分钟的全血INR、利伐沙班血浆浓度(总体和未结合浓度)和解毒剂浓度测量获得用3.2%柠檬酸钠(1:10稀释)抗凝的系列血液样本。使用Microcon设备通过超滤方法确定未结合大鼠血浆蛋白和/或r-解毒剂蛋白的利伐沙班部分。使用高效液相层析与串联质谱分析血浆样本利伐沙班浓度。用加权最小二乘回归分析产生的校准标准曲线进行定量。结果呈现于图28中。

[0456] 实施例20. 大鼠给药r-解毒剂对利伐沙班活性的持续逆转

[0457] 如实施例18所述麻醉大鼠并插管。大鼠以0.25mg/kg/hr通过静脉施用来施用利伐沙班或运载体(载体=速率5.24mL/kg/hr下水中的50%聚乙二醇)。在30分钟, 利伐沙班输注停止并在5分钟内以4mg IV推注施用r-解毒剂, 接着保持4mg/小时的输注完成其余研究(额外的55分钟)。为0、30(在利伐沙班输注结束前)、35(推注治疗给药结束)、60和90分钟的全血INR、利伐沙班(总体和未结合血浆浓度)和r-解毒剂血浆浓度测量获得用3.2%柠檬酸钠(1:10稀释)抗凝的系列血液样本。如实施例18所述确定全血INR/PT。如实施例23所述以ELISA确定r-解毒剂浓度。使用高效液相层析与串联质谱分析血浆样本的利伐沙班浓度。采用加权最小二乘回归分析产生的校准标准曲线进行定量。使用Microcon设备通过超滤方法确定未结合大鼠血浆蛋白和/或r-解毒剂蛋白的利伐沙班部分。

[0458] 图29A和B展示按全血INR和PT比率测量的大鼠中IV施用r-解毒剂对利伐沙班诱导的抗凝血的持续逆转。按35和60分钟的斯氏T检验(未配对双尾), 运载体处理组和r-解毒剂剂量组间全血INR(A组)的差异是统计学上显著的 ($p \leq 0.001$)。按35和60分钟的斯氏T检验(未配对双尾), 运载体处理组和r-解毒剂剂量组间PT比率(B组)的差异是统计学上显著的 ($p \leq 0.01$)。如实施例19中, r-解毒剂给药使利伐沙班的游离(未结合)浓度显著降低。

[0459] 实施例21. r-解毒剂对LMW肝素依诺肝素活性的逆转

[0460] 大鼠通过腹膜内给药氯胺酮混合物麻醉, 迅速插管为(颈静脉)施用依诺肝素并为系列采血插入第二导管(股静脉)。通过在样本间缓慢灌注生理盐水使采血导管保持通畅。大鼠以6、3或1mg/kg静脉推注(1ml)施用生理盐水中稀释的依诺肝素(安万特制药(Aventis Pharma), 100mg/ml)。为依诺肝素注射后0、2、15、30、60、90和120分钟的全血INR测量获得使用3.2%柠檬酸钠(1:10稀释)抗凝的系列血液样本。使用HemochronJr即时检测装置确定INR测量值。

[0461] 如图30所示, 全血INR中3个检测剂量(1、3和6mg/kg依诺肝素)产生剂量比例延伸。大鼠血浆的抗fXa单位评估(如通过Coatest LMW肝素分析测量的)展示对于3mg/kg剂量最高抗凝对应于4抗fXa U/ml而对于1mg/kg剂量最高抗凝对应于1抗fXa U/ml。如实施例17所讨论, 抗fXaU/ml=1对应于人抗凝治疗水平。

[0462] 对于LMW肝素没有特定可用的逆转试剂。因此, 出于此目的使用硫酸鱼精蛋白, 一

种开发用于在例如冠状动脉旁路移植手术期间逆转未分级肝素的活性的试剂。对于依诺肝素,处方信息描述通过缓慢静脉输注硫酸鱼精蛋白可以获得高至60%活性的中和。但是,由于逆转的不完全程度,加上血液动力学和过敏性副作用(Weiss和Adkinson, Clin RevAllergy, 1991, 9:339)的可能性,这种逆转模式很少用于依诺肝素治疗患者的首选模式。

[0463] 为了测试r-解毒剂逆转依诺肝素诱导的抗凝血的能力,并和鱼精蛋白逆转的程度结果比较,我们以下述方案测试试剂:大鼠在t=0以静脉推注(1ml)施用3.0mg/kg的生理盐水稀释的依诺肝素或运载体(生理盐水)。依诺肝素注射10分钟后,以5分钟静脉推注给药运载体、解毒剂(5mg)或硫酸鱼精蛋白(0.9mg,西格玛公司(Sigma))。接着保持输注至完成其余研究(额外的45分钟,5mg/小时用于r-解毒剂和生理盐水用于鱼精蛋白)。为0、5、15(推注治疗施用结束)、30和60分钟的血浆aPTT和解毒剂浓度测量获得使用3.2%柠檬酸钠(1:10稀释)抗凝的系列血液样本。使用麦拉伊莱克特拉(MLAElectra) 800自动凝血计时器测定血浆aPTT测量值。按制造商的指示血浆样本(100u1)中自动配入氯化钙和肌动蛋白FS PTT试剂(德灵公司(Dade Behring公司))。

[0464] 图31展示施用r-解毒剂以及鱼精蛋白对依诺肝素诱导的抗凝血的持续逆转。按15、35和60分钟的斯氏T检验(未配对双尾),运载体处理组和r-解毒剂或鱼精蛋白处理组间aPTT的差异是统计学上显著的($p \leq 0.04$)。在r-解毒剂或鱼精蛋白组的aPTT校正间没有统计学显著差异($p = 0.27$)。因此,在这一系列大鼠研究中,r-解毒剂能够与目前可用的LMW肝素解毒剂(硫酸鱼精蛋白)的抗凝血逆转能力相匹配。

[0465] 实施例22.全血INR测量的IV施用r-解毒剂对贝曲西班诱导的抗凝血的持续逆转

[0466] 如实施例18所述将大鼠麻醉和插管。大鼠以1.0mg/kg/hr IV或运载体(水中的50%聚乙二醇)施用贝曲西班30分钟(4.0mL/kg/hr)。在30分钟,贝曲西班输注停止并在5分钟内以5mg IV推注施用解毒剂,接着保持5mg/小时的输注完成其余研究(额外的55分钟)。为0、30(在贝曲西班输注结束前)、35(推注治疗施用结束)、60和90分钟的全血INR、贝曲西班和解毒剂浓度测量获得使用3.2%柠檬酸钠(1:10稀释)抗凝的系列血液样本。在Hemochron Jr设备上使用柠檬酸PT盒确定全血INR测量值。使用高效液相层析与串联质谱分析血浆样本的贝曲西班浓度。用加权最小二乘回归分析产生的校准标准曲线进行定量分析。如实施例23所述用ELISA确定r-解毒剂浓度。

[0467] 图32展示r-解毒剂给药后逆转贝曲西班活性的程度。在60分钟($p \leq 0.05$)并在35分钟和90分钟($p \leq 0.01$),运载体处理组和r-解毒剂概要组间全血INR的差异是统计学上显著的。按斯氏T检验(未配对双尾)进行统计分析。表8展示大鼠中持续校正抗凝血所需的r-解毒剂对贝曲西班的比例。大鼠中持续逆转抗凝血需要2倍的r-解毒剂对贝曲西班比例。

[0468] 表8-大鼠中持续校正所需的r-解毒剂对贝曲西班的比例

[0469]

时间点	30'	35'	60'	90'
仅贝曲西班(uM)	0.169	0.062	0.045	0.048
贝曲西班+解毒剂(uM)	0.154	1.571	1.879	1.190
解毒剂浓度(uM)	0.0	5.5	3.5	2.5
解毒剂/贝曲西班(摩尔比)	0.0	3.5	1.9	2.1

[0470] 实施例23.r-解毒剂在大鼠中的药代动力学

[0471] 对四只Sprague-Dawley大鼠5分钟短时静脉输注施用1mg解毒剂。收集系列血浆样品并使用酶联免疫吸附试验分析解毒剂浓度(ELISA,酶研究实验室,目录#:FX-EIA)。以两室模型描述解毒剂的血浆浓度-时间图。解毒剂的全身清除低(1.65ml/min/kg)而且分布体积小(0.27L/kg)。分布半寿期是19分钟,接着更长的终端半寿期为10小时。如果在一位患者要达到抗凝血的立即和接近完全逆转,基于大鼠实验(实施例18、19、20和22)r-解毒剂浓度与循环fXa抑制剂浓度的比例预计将定位在大约2附近。因此,为了立即保持解毒剂的血药浓度超过fXa抑制剂的浓度,在过量治疗期间人类剂量选择上,预计分布半寿期比终端半寿期具有更大的影响。

[0472] 图33展示Sprague-Dawley大鼠的r-解毒剂血浆浓度-时间曲线。

[0473] 实施例24.r-解毒剂在恒河猴中的药代动力学

[0474] 两只动物各自通过10分钟静脉注射给药10mg解毒剂。为测定 $T_{1/2}$ 按大鼠研究中类似的方式(实施例23)进行柠檬酸抗凝血浆样品分析,除了用柠檬酸钡吸附预处理血浆样品以消除内源性猴FX。血浆清除半寿期($T_{1/2}$)为约30分钟(图34,平均血浆解毒剂浓度)。

[0475] 为了从猴血浆消除内源性fX以减少对ELISA测量的干扰,猴血浆样品(50uL)混合3.2%的柠檬酸钠(5uL),接着加入1M氯化钡(5uL)。混合物置于冰上60分钟并用微型离心机以13000rpm离心澄清15分钟。上清(30uL)与20uL TBS/EDTA缓冲液(20mM Tris/150mM NaCl/50mM EDTA, pH7.4)混合。这导致与开始的血浆样品1:2稀释的50uL最终混合物。然后以对大鼠血浆(实施例23)相同的ELISA程序确定解毒剂的浓度。

[0476] 图34展示了恒河猴中r-解毒剂的血浆浓度-时间曲线。

[0477] 实施例25.r-解毒剂逆转fXa抑制剂的计划人类剂量的建模

[0478] 为了预测r-解毒剂的人类治疗剂量,使用WinNonlin软件程序(版本5.2)进行了一系列模拟。模拟相关的假设如下:

[0479] 1.计划的r-解毒剂循环半寿期(1-3小时)是基于Sprague-Dawley大鼠的药代动力学(分布体积,大鼠 $V_c=13\text{ml}$,根据异种类比(allometric scaling)人类是3033ml)(实施例23)。

[0480] 2.从文献报道(健康的老年志愿者中30mg剂量,Kubitza D,Becka M,Roth A,Mueck W. Curr Med Res Opin.2008Oct;24(10):2757-65.Epub 2008Aug 19)推算20mg剂量后利伐沙班的血浆浓度。为模拟利伐沙班治疗的患者中的过-抗凝血,对于r-解毒剂逆转以2倍高的浓度为目标。

[0481] 3.从W0 2008/073670(以整体引用的方式并入本文)和Turpie等人,Thromb Haemost.2009Jan;101(1):68-76)推算40mg和80mg剂量后贝曲西班的血浆浓度。为了模拟贝曲西班治疗的患者过-抗凝血,对于r-解毒剂逆转以5倍高的浓度为目标。

[0482] 4.以利伐沙班或贝曲西班的最大血药浓度(C_{max})施用r-解毒剂。

[0483] 5.在短(1小时)或延长时间(6小时)内保持r-解毒剂水平的摩尔浓度比fXa抑制剂的水平高2倍。这是为了保证fXa抑制剂的抗凝血活性接近完全逆转。

[0484] 6.r-解毒剂药代动力学遵循一室开放式模型(one compartment open model)。

[0485] 图35A和35B展示施用r-解毒剂中和利伐沙班活性的模拟时间进程曲线。在图35A中,400mg剂量的r-解毒剂(推注给药)逆转20mg剂量的利伐沙班,同时假设r-解毒剂的 $T_{1/2}$

为3小时。在图35B中,使用900mg剂量的r-解毒剂(推注加6小时输注)逆转20mg剂量的利伐沙班,同时假设r-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为1小时。

[0486] 表9-12展示基于上述预测计划的剂量。

[0487] 表9-逆转利伐沙班(10mg)抗凝血所需的r-解毒剂的计划剂量

[0488]

利伐沙班 浓度提高	覆盖 时间	上述抑制 剂的r-解 毒剂浓度	解毒剂 $T_{1/2}$ (hr)	解毒剂 剂量 (mg)		总剂量 (mg)
1x	1 hr	1x	1	IV推注	60	60
1x	1 hr	1x	3	IV推注	40	40
1x	1 hr	2x	1	IV推注	120	120
1x	1 hr	2x	3	IV推注	80	80
2x	1 hr	1x	1	IV推注	120	120
2x	1 hr	1x	3	IV推注	80	80
2x	1 hr	2x	1	IV推注	240	240
2x	1 hr	2x	3	IV推注	160	160
1x	6 hr	1x	1	推注+输注 或IV推注	50 + 62.5 800	112.5 800
1x	6 hr	1x	3	IV推注	50	50
1x	6 hr	2x	1	推注+输注 或IV推注	100 + 125 1600	225 1600
1x	6 hr	2x	3	IV推注	100	100
2x	6 hr	1x	1	推注+输注 或IV推注	100 + 125 1600	225 1600
2x	6 hr	1x	3	IV推注	100	100
2x	6 hr	2x	1	推注+输注 或IV推注	200 + 250 3200	450 3200
2x	6 hr	2x	3	IV推注	200	200

[0489] 表10-逆转贝曲西班(80mg QD)抗凝血所需的r-解毒剂的计划剂量

[0490]

贝曲西班 浓度提高	覆盖 时间	上述抑制 剂的r-解 毒剂浓度	解毒剂 $T_{1/2}$	解毒剂 剂量	总剂量	
1x	1 hr	1x	1	IV推注	20	20
1x	1 hr	1x	3	IV推注	13	13
1x	1 hr	2x	1	IV推注	40	40
1x	1 hr	2x	3	IV推注	26	26
5x	1 hr	1x	1	IV推注	103	103
5x	1 hr	1x	3	IV推注	66.5	66.5
5x	1 hr	2x	1	IV推注	206	206
5x	1 hr	2x	3	IV推注	133	133
1x	6 hr	1x	1	推注+输注 或IV推注	40 + 50 190	90 190
1x	6 hr	1x	3	IV推注	40	40
1x	6 hr	2x	1	推注+输注 或IV推注	80 + 100 380	180 380
1x	6 hr	2x	3	IV推注	80	80
5x	6 hr	1x	1	推注+输注 或IV推注	200 + 250 950	450 950
5x	6 hr	1x	3	IV推注	200	200
5x	6 hr	2x	1	推注+输注 或IV推注	400 + 500 1900	900 1900
5x	6 hr	2x	3	IV推注	400	400

[0491] 表11-逆转利伐沙班 (20mg) 抗凝血所需的r-解毒剂的计划剂量

[0492]

利伐沙班 剂量	利伐沙班 浓度增加	覆盖 时间	上述抑制剂 的解毒剂浓 度	解毒剂 T _{1/2} (hr)	解毒剂剂量		总剂量 (mg)
20 mg	1x	1 hr	1x	1	IV 推注	120 mg	120
	1x	1 hr	1x	3	IV 推注	80 mg	80
	1x	1 hr	2x	1	IV 推注	240 mg	240
	1x	1 hr	2x	3	IV 推注	160 mg	160

[0493]

2x	1 hr	1x	1	IV 推注	240	mg	240
2x	1 hr	1x	3	IV 推注	160	mg	160
2x	1 hr	2x	1	IV 推注	480	mg	480
2x	1 hr	2x	3	IV 推注	320	mg	320
					100 +		
1x	6 hr	1x	1	推注+ 输注	125	mg	225
				或 IV 推注	1600	mg	1600
1x	6 hr	1x	3	IV 推注	100	mg	100
					200 +		
1x	6 hr	2x	1	推注+ 输注	250	mg	450
1x	6 hr	2x	3	IV 推注	200	mg	200
					200 +		
2x	6 hr	1x	1	推注+ 输注	250	mg	450
2x	6 hr	1x	3	IV 推注	100	mg	100
					400		
2x	6 hr	2x	1	推注+ 输注	+500	mg	900
2x	6 hr	2x	3	IV 推注	200	mg	200

[0494] 表12-逆转贝曲西班 (40mg QD) 抗凝血所需的r-解毒剂的计划剂量

[0495]

贝曲西班 剂量	贝曲西班 浓度增加	覆盖 时间	上述抑 制剂的 解毒剂 浓度	解毒剂	解毒剂剂量			总剂量
				T _{1/2} (hr)				(mg)
40 mg QD	1x	1 hr	1x	1	IV 推注	20	mg	20
	1x	1 hr	1x	3	IV 推注	13	mg	13
	1x	1 hr	2x	1	IV 推注	40	mg	40
	1x	1 hr	2x	3	IV 推注	26	mg	26
	5x	1 hr	1x	1	IV 推注	103	mg	103
	5x	1 hr	1x	3	IV 推注	66.5	mg	66.5
	5x	1 hr	2x	1	IV 推注	206	mg	206
	5x	1 hr	2x	3	IV 推注	133	mg	133
	1x	6 hr	1x	1	推注+ 输注	40 + 50	mg	90
					或 IV 推注	190	mg	190
	1x	6 hr	1x	3	IV 推注	40	mg	40
	1x	6 hr	2x	1	推注+ 输注	80 + 100	mg	180
					或 IV 推注	380	mg	380
	1x	6 hr	2x	3	IV 推注	80	mg	80
								0
	5x	6 hr	1x	1	推注+ 输注	200 +250	mg	450
					或 IV 推注	950	mg	950
	5x	6 hr	1x	3	IV 推注	200	mg	200
	5x	6 hr	2x	1	推注+ 输注	400 + 500	mg	900
					或 IV 推注	1900	mg	1900

[0496]

5x	6 hr	2x	3	IV 推注	400	mg	400
----	------	----	---	-------	-----	----	-----

[0497] 实施例26.r-解毒剂逆转LMW肝素的预测人类剂量的建模

[0498] 为了预测r-解毒剂的人类治疗剂量,使用以下假设进行了一系列模拟:

[0499] 1.根据依诺肝素的处方信息,在皮下给药1mg/kg依诺肝素治疗的不稳定型心绞痛患者中,最高抗-fXa活性对应1.1U/ml。为模拟抗凝血的超治疗水平,为逆转将循环抗fXa单位的范围以2-4U/ml为目标。

[0500] 2.在健康人志愿者中,皮下给药依诺肝素的平均绝对生物利用度是92%。因此认为从大鼠静脉给药研究的结果相当于皮下给药获得的结果。

[0501] 3.从大鼠的有效剂量计算逆转LMW肝素抗凝血作用的计划人类剂量并由于物种之间的血容量差异,通过校正扩展到人类(戴维斯和莫里斯(B.Davies and T Morris),药学研究(Pharm Res),10(7),1993,pp 1093-1095)。

[0502] 4.认为大鼠血浆中LMW肝素抗fXa单位的测量与人体血浆中测得的是等同的。

[0503] 5.药效标志物的完全逆转(aPTT或抗fXa单位)是中和FXA抑制剂活性和止血能力恢复(即完全逆转抗凝)所必需的。

[0504] 模拟结果表明:

[0505] a) 逆转依诺肝素治疗水平活性的r-解毒剂总剂量是500mg-1g。

[0506] b) 逆转依诺肝素超治疗水平活性的r-解毒剂总剂量是500mg-2g。

[0507] 图36A和36B展示r-解毒剂中和贝曲西班牙活性的模拟时间进程曲线。在图36A中,400mg剂量的r-解毒剂(推注给药)逆转80mg剂量的贝曲西班牙,同时假设r-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为3小时。在图36B中,使用900mg剂量的r-解毒剂(推注加6小时输注)逆转80mg剂量的贝曲西班牙,同时假设r-解毒剂的 $T_{1/2}$ 为1小时。

[0508] 实施例27.r-解毒剂在恒河猴中逆转利伐沙班

[0509] 在图37中,基于采自四只恒河猴的柠檬酸抗凝血浆的检测,提供r-解毒剂逆转利伐沙班抗凝血的效果。如实施例12所述测量了凝血酶原时间。对于个别猴子基线凝血时间,添加利伐沙班(250nM或1uM)产生凝血酶原时间(PT)的剂量-反应延长。添加250nM利伐沙班从 17.5 ± 1.6 秒的基线值产生 32.3 ± 6.1 秒(平均 $\pm$ 标准偏差)的延长。利伐沙班处理的血浆样品中添加r-解毒剂逆转抗凝血效果,244nM校正PT到 25 ± 7 秒和488nM校正PT到 19.9 ± 1.9 秒。仅在基线血浆添加r-解毒剂不改变PT(17.7秒)。

[0510] 实施例28.大鼠中r-解毒剂对由依诺肝素和磺达肝素引起的血液损失的逆转

[0511] 在Sprague-Dawley大鼠中测试r-解毒剂对依诺肝素抗凝引起的血液损失的逆转作用。特别地,采用止血恢复的大鼠尾部横切血液损失模型。通过静脉推注(4.5mg/kg)给药依诺肝素。以两种剂量施用r-解毒剂:1) 2mg推注接以2mg/小时的速度共15分钟的输注;2) 4mg推注接以4mg/小时的速度共15分钟的输注。采用载体测试血液损失逆转。r-解毒剂推注完成后立即开始输注,用手术刀刀片横切鼠尾尖部并置入在37℃盛有生理盐水的小瓶中。使尾部出血15分钟。裂解红细胞确定产生的血液体积,用分光光度计测量血红蛋白浓度并与标准曲线相比估计血液体积。降低的血液损失与r-解毒剂血浆浓度($r^2=0.80$)和抗-fXa单位($r^2=0.89$)的减少均相关。结果在图38中提供(关于r-解毒剂的AD)。

[0512] 在相同的模型中,r-解毒剂完全校正了由于施用磺达肝素(25mg/kg)提高的血液

损失。鱼精蛋白(以0.9mg静脉注射推注)不能展示校正活性。r-解毒剂以6mg推注接另一6g/小时输注15分钟提供。结果在图39中提供。

[0513] 正如从图38和图39所见,这些结果证明除了中和直接fXa抑制剂,r-解毒剂还能够中和间接fXa抑制剂并具有通过逆转两类药物介导的抗凝血而恢复止血的潜能。

[0514] 在相同模型中,通过以2mg推注接着以2mg/小时输注施用r-解毒剂,由于依诺肝素(以4.5mg/kg静脉推注)引起的血液损失降低到42%并以4mg推注接以4mg/小时输注施用r-解毒剂完全逆转。结果如图41所示。

[0515] 在相同模型中,通过以6mg推注接以6mg/小时输注施用r-解毒剂,由于磺达肝素(以25mg/kg静脉推注)引起的血液损失被完全逆转。相反地,以0.9mg推注施用的鱼精蛋白没有逆转血液损失。这些结果如图43所示。

[0516] 基于大鼠重量约和人类差200倍的假设,这些数据与目前主张的发明保持一致。

[0517] 实施例29.血浆抗-fXa单位测量的推注r-解毒剂施用后对依诺肝素和磺达肝素诱导的抗凝血的逆转

[0518] 抗-fXa活性已经用于临床测量LMWH处理获得的抗凝血水平并与临床结果相关(Montalescot等人,Circulation,2004,110(4):392-8)。

[0519] 血浆抗-fXa活性分析测量r-解毒剂对依诺肝素-诱导的抗凝血的效果。抗-fXa活性分析是基于一种依据抗-fXa单位表达LMWH的抗凝血活性的改进的LMWH分析试剂盒(Coamatic LMWH)。抗-fXa单位分析使用fXa生色底物(S2732)测量血浆中残余fXa(牛fXa)活性。依诺肝素标准品(U/ml)的已知浓度用于构建标准曲线以测量未知样品中的抗-fXa单位(U/ml)。

[0520] 以1mg、2mg、或4mg的剂量作为推注施用r-解毒剂。这些结果描绘于图40。正如所见,解毒剂以剂量-响应方式逆转了依诺肝素-诱导的抗凝血作用。

[0521] 在相同模型中,以1mg/kg(IV推注)的剂量施用磺达肝素,接着r-解毒剂(在开始5分钟4mg推注+4mg/小时输注直到实验结束)。如图44所示,磺达肝素的抗-fXa活性的提高是快速的并基本上被r-解毒剂的施用逆转。

[0522] 采用已知磺达肝素浓度作为标准,以ug/ml表示磺达肝素的抗-fXa活性。当使用依诺肝素作为标准检测,1ug/ml依诺肝素与大鼠血浆中的0.66U/ml依诺肝素,或者人类血浆中的0.80U/ml依诺肝素是等价的。

[0523] 实施例30.在大鼠尾部横切模型中血液损失、抗-fXa单位和rfXa解毒剂浓度的相关性

[0524] 图42a、42b和42c展示大鼠尾部横切模型中的血液损失与作为抗-fXa单位($r^2=0.887$)测量的依诺肝素浓度之间的相关性。抗-fXa单位与rfXa解毒剂浓度是指正好在尾部横切之前15分钟的时间点获得的水平。结果证明了血液损失上的一个急剧增加当依诺肝素浓度提高到 >1.5 抗-fXa单位/ml,在这一模型获得的最大血液损失上形成一个平台,意味着在15分钟收集时间内损失了大约5%的正常大鼠血液体积。在最初的模型建立实验中测试了更高的依诺肝素浓度,但未证明更高的血液损失。进一步的相关性分析展示在血液损失和rfXa解毒剂浓度间 $r^2=0.887$ 和在抗-fXa单位和rfXa解毒剂浓度间 $r^2=0.689$ 。

[0525] 应了解,尽管已结合上述实施例阐述本发明,但以上说明和实施例意欲阐释而非限制本发明的范围。对于所属领域的技术人员在本发明范围内的其它方面、优点和修改将

显而易见。

[0526] 表13-Sequence ID NO.1-人类因子X的多肽序列

[0527]

1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE
61	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
121	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR
181	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE
241	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
301	AVHEVEVVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRLKT	PITFRMNVP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
361	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIITQ	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG
421	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE
481	VITSSPLK					

[0528] 表14-Sequence ID NO.2-编码因子X的多核苷酸序列

[0529]

1	gactttgctc	cagcagcctg	tcccagtgag	gacagggaca	cagtactcgg	ccacaccatg
61	gggagccccc	tgcacctcgt	cctgctcagt	gcctccctgg	ctggcctcct	gctgctcggg
121	gaaagtctgt	tcatccgcag	ggagcaggcc	aacaacatcc	tggcgagggt	cacgagggcc
181	aattccattc	ttgaagagat	gaagaaagga	caactcgaaa	gagagtgcac	ggaagagacc
241	tgtccatcac	aagagggccc	cgaggtcttt	gaggacagcg	acaagacgaa	tgaattcttg
301	aataaataca	aagatggcga	ccagtgtgag	accagtcctt	gccagaacca	gggcaaatgt
361	aaagacggcc	tccgggaata	caactgcacc	tgtttagaag	gattcgaagg	caaaaactgt
421	gaattattca	cacggaagct	ctgcagcctg	gacaacgggg	actgtgacca	gttctgccac
481	gaggaacaga	actctgtggt	gtgctcctgc	gcccgcgggt	acaccctggc	tgacaacggc
541	aaggcctgca	ttcccacagg	gccctacccc	tgtgggaaac	agaccctgga	acgcaggaag
601	aggtcagtgg	cccaggccac	cagcagcagc	ggggaggccc	ctgacagcat	cacatggaag
661	ccatatgatg	cagccgacct	ggaccccacc	gagaacccct	tcgacctgct	tgacttcaac
721	cagacgcagc	ctgagagggg	cgacaacaac	ctcaccagga	tcgtgggagg	ccaggaatgc
781	aaggacgggg	agtgtccctg	gcaggccctg	ctcatcaatg	aggaaaacga	gggtttctgt
841	ggtggaacca	ttctgagcga	gttctacatc	ctaacggcag	cccactgtct	ctaccaagcc
901	aagagattca	aggtgagggt	aggggaccgg	aacacggagc	aggaggaggg	cggtagggcg
961	gtgcacgagg	tggagggtgt	catcaagcac	aaccggttca	caaaggagac	ctatgacttc
1021	gacatcgccg	tgctccggct	caagaccccc	atcaccttcc	gcatgaacgt	ggcgccctgcc
1081	tgccctcccc	agcgtgactg	ggccgagctc	acgctgatga	cgcagaagac	ggggattgtg
1141	agcggcttcg	ggcgacccca	cgagaagggg	cggcagtgca	ccaggctcaa	gatgctggag
1201	gtgccctacg	tggaccgcaa	cagctgcaag	ctgtccagca	gcttcatcat	caccagcaac
1261	atgtttctgtg	ccggctacga	caccaagcag	gaggatgcct	gccaggggga	cagcgggggc
1321	ccgcacgtca	cccgttcaa	ggacacctac	ttcgtgacag	gcacgtcag	ctggggagag
1381	ggctgtgccc	gtaaggggaa	gtacgggatc	tacaccaagg	tcaccgcctt	cctcaagtgg
1441	atcgacaggt	ccatgaaaaa	caggggcttg	cccaaggcca	agagccatgc	cccggaggtc
1501	ataacgtcct	ctccattaaa	gtgagatccc	actcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa

[0530] 表15-Sequence ID NO.3-成熟人类因子X的多肽序列

[0531]

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRLKT	PITFRMNVP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

[0532] 表16-Sequence ID NO.4-缺失1-40位氨基酸残基的无Gla-结构域因子Xa的多肽序列

[0533]

轻链	1	KDGDQC ETSPCQNQGK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCSC ARGYTLDN
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
重链	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKLML EPPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0534] 表17-Sequence ID NO.5-缺失1-45位氨基酸残基的无Gla-结构域因子Xa的多肽序列

[0535]

轻链	1	DGDQC ETSPCQNQGK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCSC ARGYTLDN
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
重链	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKLML EPPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0536] 表18-Sequence ID NO.6-谷氨酸翻译后为 γ -羧基谷氨酸之前活化的人因子Xa的多肽序列

[0537]

轻链	1	ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGDQC ETSPCQNQGK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCSC ARGYTLDN
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
重链	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKLML EPPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0538] 表19-Sequence ID NO.7-谷氨酸翻译后为 γ -羧基谷氨酸后活化的人因子Xa的多肽序列(γ 代表 γ -羧基谷氨酸残基)

[0539]

轻链	
1	ANSFLYYMKK GHLYRYCMYY TCSYYYARYV FYDSDKTNFY WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
重链	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0540] 表20-Sequence ID NO.8-谷氨酸翻译后为 γ -羧基谷氨酸后活化的人因子Xa-轻链的多肽序列

[0541]

轻链	
1	ANSFLYYMKK GHLYRYCMYY TCSYYYARYV FYDSDKTNFY WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER

[0542] 表21-Sequence ID NO.9-活化的人因子Xa-重链的多肽序列

[0543]

181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0544] 表22-Sequence ID NO.10-去G1a的无水-fXa的多肽序列($\tilde{A}$ 代表脱氢丙氨酸)

[0545]

轻链	
1	KDGQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
重链	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGD $\tilde{A}$ G GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0546] 表23-Sequence ID NO.11-去G1a的fXa-S379A的多肽序列

[0547]

轻链	
1	DGDQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
重链	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGD $\tilde{A}$ G GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

[0548] 表24-Sequence ID NO.12-去除RKRRKR (SEQ ID NO.17) 接头之前的人因子Xa三突变体的多肽序列

[0549]

轻链	1	ANSFL	F	WNKYKDGQ	ETSPCQNQ	GK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN				
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER				
Linker		RKRRKR				
重链	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ				
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP				
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EYPYVDRNSC KLSSSFIITQ				

[0550]

361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

[0551] 表25-Sequence ID NO.13-去除RKRRKR (SEQ ID NO.17) 接头之后的人因子Xa三突变体的多肽序列

[0552]

轻链	1	ANSFL	F	WNKYKDGQ	ETSPCQNQ	GK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN				
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER				
重链	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ				
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP				
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EYPYVDRNSC KLSSSFIITQ				
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK			
	421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK				

[0553] 表26-Sequence ID NO.14-分泌后人因子Xa三突变体轻链片段的多肽序列

[0554]

1	ANSFL	F	WNKYKDGQ	ETSPCQNQ	GK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN				
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER				

[0555] 表27-Sequence ID NO.15-分泌后人因子Xa三突变体重链片段的多肽序列

[0556]

重链	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ				
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP				
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EYPYVDRNSC KLSSSFIITQ				
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK			
	421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK				

[0557]

表28-Sequence ID NO. 16-编码r-解毒剂(因子X三突变体)的多核苷酸序列

```

1  ATGGGGCGCC CACTGCACCT CGTCCTGCTC AGTGCTGCCCT TGGCTGGCCTT CCTGCTGCTC GGGGAAAAGTC TGTTCATCCG CAGGAGCGAG GCCAACAAACA
101 TCCTGGCGAG GGTACGAGG GCCAATTCCT TTCTTTTCTG GAATAAATAC AACAGTGGC ACCAGTGTGA GACCAGTCCT TGCCAGAACC AGGGCAAATG
201 TAAAGACGGC CTCGGGGAAT ACACCTGCAC CTGTTTAGAA GGATTCGAAG GCAAAAACCTG TGAATTATTG ACACGGAAGC TCTGCAGCCT GGACAACGGG
301 GACTGTGACC AGTTCTGCCA CGAGGAACAG AACTCTGTGG TGTGCTCCTG CGCCCGCGGG TACACCCCTGG CTGACAAACGG CAAGGCCTGC ATTCCACAG
401 GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCCCTGG AACGAGGAA AGGATCGTGG GAGGCCAGGA ATGCAAGGAC GGGGAGTGTG CTTGGCAGGC
501 CCTGCTCATC AATGAGGAAA ACGAGGGTTT CTGTGGTGGG ACCATTCTGA GCGAGTTCTA CATCCTAACG GCAGCCCACT GTCTCTACCA AGCCAAGAGA
601 TTCAAGGTGA GGTAGGGA CCGGAACACG GAGCAGGAGG AGGCGGTGA GCGGTGCAC GAGGTGGAGG TGGTCATCAA GCACAACCGG TTCACAAAGG
701 AGACCTATGA CTTGACATC GCCGTGCTCC GGCTCAAGAC CCCATCAC TTCCGCATGA ACCTGGCGCC TGCCTGCCCT CCCGAGCGTG ACTGGGCCGA
801 GTCCACGCTG ATGACGCAGA AGACGGGGAT TGTGAGCGGC TTCGGGGCGCA CCCACGAGAA GGGCCGGCAG TCCACCAGG TCAAGATGCT GGAGGTGCCC
901 TACGTGGACC GCAACAGCTG CAAGCTGTCC AGCAGCTTCA TCATCACCCA GAACATGTTT TGTGCCGGCT TGTGCCGGCT ACGACACCAA GCAGGAGGAT GCCTGCCAGG
1001 GGGACGCAGG GGGCCCCGAC GTACCCCGCT TCAAGGACAC CTACTTCGTG ACAGGCATCG TCAGCTGGGG AGAGGGCTGT GCCCGTAAGG GGAAGTACGG
1101 GATCTACACC AAGTCAACG CCTTCCTCAA GTGGATCGAC AGTCCATGA AAACCAAGGG CTTGCCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCCCGGA GTTCATAACG
1201 TCCTCTCCAT TAAAGTGA

```

[0558]

表29-Sequence ID NO. 18-r-解毒剂表达载体的多核苷酸序列

1	TCTAGACACA	GTACTCGGCC	ACACCATGGG	GGGCCCACTG	CACCTCGTCC	TGCTCAGTGC	CTCCCTGGCT	GGCTCTCTGC	TGCTCGGGGA	AAGTCTGTTC
101	ATCCGCAGG	AGCAGGCCAA	CAACATCCTG	CGAGGGTCA	CGAGGCCAA	TTCCCTTCTT	TTCTGAATA	AATACAAAGA	TGGCGACAG	TGTGAGACCA
201	GTCCTTGCCA	GAACCAAGGC	AAATGTAAAG	ACGGCTCCG	GGAAATACAG	TGCACCTGTT	TAGAAGATT	CGAAGGCAA	AAGTGTGAAT	TATTCACACG
301	GAAGCTCTGC	AGCCTGGACA	ACGGGACTGC	TGACCACTTC	TGACCACTTC	GGAAATACAG	TGCTGCTGTC	TCCCTGCGCC	CGGGTACAC	CCTGGCTGAC
401	AACGGCAAGG	CCTGCATTCC	CACAGGCCC	TACCCCTGTG	GGAAACAGAG	CCTGGAACGC	AGGAAGAGGA	GGAAGAGGAT	CGTGGAGGC	CAGGAATGCA
501	AGGACGGGGA	GTGTCCCTGG	CAGGCCCTGC	TCATCAATGA	GGAAACAGAG	GGTTTCTGTG	GTGGAACCAT	TCTGAGCGAG	TTCTACATCC	TAAACGGCAG
601	CCACTGTCTC	TACCAAGCCA	AGAGATTCAA	GGTGAGGTA	GGGGACCGGA	ACACGGAGGC	GGAGGAGGC	GFTGAGCGG	TGCACAGGT	GGAGGTGGTC
701	ATCAAGCACA	ACCGGTTTCA	AAAGAGACG	TATGAGTTCC	ACATCGCCGT	GCTCCGGCTC	AAGACCCCA	TACCTTCCG	CATGAACGTG	GGCCTGCGCT
801	GCCTCCCCGA	CGGTGACTGG	CGCGAGTCCA	CGCTGATGAC	CGAGAGACG	GGGATGTGTA	CGGCTTCCG	GGCACCCAC	GAGAAGGGCC	GGCAGTCCAC
901	CAGGCTCAAG	ATGCTGGAGG	TGCCCTACGT	GGACCGCAAC	AGCTGCAAGC	TGTCCACGAG	CTTCAATCAT	ACCCAGAACA	TGTTCTGTGC	CGGTACGAC
1001	ACCAAGCAGG	AGGATGCCTG	CCAGGGGGAC	GCAGGGGGC	CGCAGTCAAC	CGCTTCAAG	GACACCTACT	TGCTGACAGG	CATCTCAGC	TGGGGAGAGG
1101	GCTGTGCCG	TAAAGGGAG	TACGGGATCT	ACACCAAGT	CACCGCTTC	TCGAAGTGA	TCGACAGGTC	CATGAAAACC	AGGGCTTGC	CCAAAGGCCAA
1201	GAGCCATGCC	CCGGAGGTCA	TAACGTCCTC	TCCATTAAAG	TGAGATCCCA	CTCGGATCCC	TATTTCTATAG	TGTCACCTAA	ATGCTAGAGC	TCCGTGATCA
1301	GCCTCGACTG	TGCCCTTAG	TTGCCAGCCA	GTGTTGTGTT	GCCTCTCCC	CGTCCCTTCC	TGACCTTGG	AAGTGGCCAC	TCCCACCTGC	CTTTCCTAAT
1401	AAATGAGGA	AATTGCATCG	CATTGTCTGA	GTAGGTGTCA	TTCTATTCTG	GGGGGTGGG	TGGGGCAGGA	CAGCAAGGG	GAGGATTGGG	AAGACAATAG
1501	CAGGCATGCT	GGGGATGCGG	TGGGCTCTAT	GGCTTCTGAG	GCAGAAAGAA	CCAGCTGGG	CTCGAGCGG	CGCCCTTCT	GAGGCGAAA	GAACCAAGTC
1601	TGGAATGTGT	GTCAAGTAGG	GTGTGGAAG	TCCCCAGGCT	CCCCAGCAGG	CAGAAGTATG	CAAGCATGTC	ATCTCAATTA	GTCAAGAAC	AGGTGTGGAA
1701	AGTCCCCAGG	CTCCCCAGCA	GGCAGAAGTA	TGCAAGCAT	GCATCTCAAT	TAGTCAGCAA	CCATAGTCCC	GGCCCTAAT	CGCCCATCC	CGCCCCTAAC
1801	TCCGCCCAT	TCCGCCCAT	CTCCGCCCAT	TGCTGACTTA	ATTTTCTTGA	TTTATGACGA	GGCGAGGCG	GCCTCGGCT	CTGAGCTATT	CCAGAAAGTAG
1901	TGAGGAGGCT	TTTTTGGAGG	CCTAGGCTTT	TGCAAAAAAG	CTAGGCTCCC	TGTTTGCATCA	TGTTTGCATCA	ATTGAAGCTC	ATCTGCGCG	ATTTCCCAAAA
2001	TATGGGGATT	GGCAAGACG	GAGACCTACC	CTGGCTCCG	CTCAGGAAAG	AGTTCAAGTA	CTTCCAAAGA	ATGACACCAA	CCTCTTCAGT	GGAAAGTTAAA
2101	CAGAACTGCG	TGATTATGGG	TAGGAAACAC	TGGTTCTTCA	TTCTCTGAGAA	GAATCGACCT	TTAAAGGACA	GAATTAATAT	AGTTCTCAGT	AGAAAGTTCA
2201	AAGAACCACC	ACGAGGAGCT	CATTTTCTTG	CCAAAAGTTT	GGATGATGCC	TTAAGACTTA	TTGAACAACC	GGAAATGGCA	AGTAAAGTAG	ACATGGTTTG
2301	GATAGTCGGA	GGCAGTTCTG	TTTACCAGGA	AGCCATGAAT	CAACCAAGGC	ACCTTAGACT	CTTTGTGACA	AGGATCATGC	AGGAATTGGA	AAGTGACACG
2401	TTTTTCCCAG	AAATGATATT	GGGAAATAT	AACTTCTCC	CAGATACACC	AGCGTCTCTC	TCTGAGTCC	AGCAGGAAA	AGGCATCAAG	TATAAGTTTG
2501	AAGTCTACGA	GAAGAAAGAC	TAACAGGAAG	ATGCTTTCAA	GTTCTGTGCT	CCCTCTCTAA	AGCTATGCAT	TTTTTAAGA	CCATGGGACT	TTTGTGGCT
2601	TTAGATCCCG	CGGAGATCCA	GACATGATAA	GATACATTGA	TGAGTTTGA	CAAAACACAA	CTAGAATGCA	GTGAAAAAAA	TGCTTTTATT	GTGAAATTTG
2701	TGATGCTATT	GCTTTATTG	TAACCATTAT	AAGCTGCAAT	AAACAAGTTA	ACAACAACAA	TTGCAATTCAT	TTTATGTTTC	AGGTTACAGG	GGAGGTGTGG
2801	GAGGTTTTTT	AAAGCAAGTA	AAACCTCTAC	AAATGTGTA	TGGCTGATTA	TGAGTCCAG	CTTTTGTTC	CTTTAGTGAG	GGTTAATGC	GGCTTGGCG
2901	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	CGCTCACAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCG	GAAGCATAAA	GTGTAAGCC	TGGGGTGCCT
3001	AATGATGAG	CTAACTACA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT	GCCGCTTTC	CAGTCGGGA	ACCTGTCGTG	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCGC
3101	GGGAGAGGC	GGTTTGGGTA	TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG	ACTCGTGGG	CTCGTCTGTT	CGGCTGCGG	GAGCGTATC	AGCTCACTCA
3201	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCGAGC	AAAGGCGCAG	GAACCGTAAA	AAGCGCGCGT
3301	TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAAGAGTG	GGAAAAACCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA
3401	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGG	CTCTCTGTT	CCGACCTGTC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT
3501	TCTCATAGCT	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TGCGTGTAGG	TCGTTGCTCT	CAAGCTGGG	TGTTGTGACG	AACCCCGCT	TCAGCCGAC	CGCTGCGCT
3601	TATCCGGTAA	CTATCGCTTT	GAGTCCAACC	CGGTAAAGCA	CGACTTATCG	CCACTGGCA	CGACTGTCG	TAAACAGATT	AGCAGCGGA	GGTATGTAGG
3701	CGGTGCTACA	GAGTCTTTGA	AGTGTGGCC	TAACTACGCG	TACACTAGAA	CGACTGATTA	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA
3801	AGAGTTGGTA	GCTCTTTGATC	CGGCAAAACA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG	TTTTTTTTGT	TGCAAGCAGC	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG
3901	AAGATCCCTT	GATCTTTTCT	ACGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA
4001	GATCCCTTTA	AATTAAAAAT	GAAGTTTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	
4101	TCAGCGATCT	GTCTATTTCG	TTTATCCCAT	GTTCCTGCTG	TCCCGCTCGT	CTGAGATAACT	ACGATACGGG	AGGCTTACC	ATCTGGCCC	AGTGTGCTCA
4201	TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GGCAGGAAGT	GGTCTGCAA	CTTTATCCCG

[0559]

4301 CTCATCCAG TCTATTAAAT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTCGGCAAC GTTGTGGCA CATCGTGGTG
 4401 TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCGGTTT CCCACGATC AAGCGAGTT ACATGATCCC CATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT
 4501 TCGGTCTCTC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGAGT GTTATCACTC GTTATATAG ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCTATG CATCCGTAAG
 4601 ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAAGTCATTC AAGTCTATC TGAGAAATAG GTATCGGGC GTATCGGGC ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC
 4701 GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTCTC ATCATTTGAA ATCTTCTTC GGGCGAAAA CTCTCAAGGA CTTCACCGT GTTGACATCC AGTTGATGTT
 4801 AAGCCACTCG TGCAACCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTTACCAGG TTTTCAGGTT GAGCAAAAA GAGGAAGCAA AATGCCGCAA AAAAGGAAAT
 4901 AAGCGGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTCTCTT TTTCAATATT TTTCAAGCAT TTATCAGGTT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA
 5001 TGTATTTAGA AAAATAACA AATAGGGTTT CCGGCACAT TTCCCGAAA AGTGCCACCT GGGAAATTTT AAAAGTTTAA ATTTGTTTAA AATTCGCTT
 5101 AAATTTTGT TAAATCAGT CATTTTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGTT GAGTGTGTT
 5201 CCAGTTTGA ACAAGATCC ACTATTTAAAG AACGTGACT CCAACGTCAA AGGCGAAAA ACCGTCTATC AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC
 5301 CCTAATCAAG TTTTGTGGG TCGAGGTGCC GTAAAGCACT AAATCGAAC CTTAAAGGGA GCGCCGATTT TAGAGCTTGA CCGGAAAGC CGGCGAACGT
 5401 GCGGAGAAAG GAAGGGAAG AAGCGAAAG AGCGGCGCT AGGCGACTGG CAAGTGTAGC GTTCACGCTG GGTCTAAGG GTTGTAAGG GAGCGCGCT AATACGACTC
 5501 AGGGGATG TGCTGCAAG CGATTAAGTT GGGTAACGCC AGGTTTTC CAGTCACGAC GTTGTAAGG GATGTAAGG CCGACTAGC AGATGGCAAG GCTGAGGACG
 5601 AAGGGGATG TGCTGCAAG CGATTAAGTT GGGTAACGCC AGGTTTTC CAGTCACGAC GTTGTAAGG GATGTAAGG CCGACTAGC AGATGGCAAG GCTGAGGACG
 5701 ACTATAGGC GAATTTGAAAT TAAATTCGCTG GGTGAGACC CGCAGAGGAA GAGCTCTAG GATTTGTTC AGAATGCAAG TCTGACAGT TCTTCCAGG
 5801 GGAGGCTGAT TGAGAGGCGA AGGTACACC AGTACCTTG ACAACCTTG GAGCTAAGC AGCAATGGTA GAGGGAAGAT TCTGACAGT TCTTCCAGG
 5901 GGCCTCCCG TCACCACCCA CCCCACCCG CCGGACCCG AGCTGAGAGT AATTCATACA AAAGGACTCG CCCCTGCCCTT GGGGAATCCC AGGACCCGTC
 6001 GTTAAACTCC CACTAACCTA GAACCCAGAG ATCGCTGCTG TCCCGCCCC TCACCCGCC GCTCTCGTCA TCACCTGAGT GAGGAAGAG ATGCGTGAAG
 6101 CTCGCTGCC CGTCAGTGG CAGACGCAAC ATCGCCACA GTTGGGGG AGTGGGGG GAGGCTCGG AATGAAACG GTGCTAGAG AAGTGGCG
 6201 GGGTAACT GGTGCGGCG GTTGGCGCG TGTGCTGAC TGGTCCGCC TTTTTCGCC GGGTGGGGA GAACCGTATA TAAATGCAAGT AGTCGCCGTG AACGTTCTTT
 6301 TTCGCAACG GTTGGCGCG AGAACACAGG TAAATGCGCT GTGTGGTTCC CGCGGCCCTG GAGTGGGGG GAGGCTCGG AATGAAACG GTGCTAGAG AAGTGGCG
 6401 TTCACGCCC CTGGCTGCAG TACGTGATTC TTGATCCCGA GCTTCCGGTT GAAAGTGGT GAGAGAGTTT GAGGCTTGC CTTTGAATAC
 6501 TCGTGTGTA GTTGAGGCTT GGTGCGGCG CTGGGCGCG CTGGTGGCA TCTGTTGGA TCTTGTGGAAT GCGGCGCAA ATCTGCACAC TGGTATTTTCG GTTTTGGGG
 6601 ATTTAAATTT TTTGATGACC TGTGCGACG CTTTTTTCTT GGCAGAGTAG TCTTGTGGAAT TCTTGTGGAAT TCTTGTGGAAT TCTTGTGGAAT TCTTGTGGAAT
 6701 CCGCGGCGG CGACGGGCG GGTGCGTCC AGCGCACATG TTCCGCGAGG TTCCGCGAGG CCGGCGCTGC GAGCGCGGC ACCGAGAAAT GAGCGGGGT AGTCTCAAGC
 6801 TGGCCGGCCT GCTCTGTTG CTGGCTTCG CCGCCCTGCT ATCGCCCGC CTTGGGCGG CTTGGGCGG CTTGGGCGG CTTGGGCGG CTTGGGCGG CTTGGGCGG
 6901 TGGCCGCTTC CCGCCCTGCT TGCAGGAGC TCAGGATGGA TGCAGGAGC TGCAGGAGC TGCAGGAGC TGCAGGAGC TGCAGGAGC TGCAGGAGC TGCAGGAGC
 7001 CGTCCCTCAG CGTCCCTTCA TGTGACTCCA CGGAGTACCG GCGGCGGCTC AGGCACCTCG ATTAGTTCTC GAGCTTTTGG AGTACGCTCG CTTTAGGTTG
 7101 GGGGAGGGG TTTTATGCGA TGGAGTTTCC CCACACTGAG TGGGTGGAGA CTGAAGTTAG GCGAGCTTG CACTTGATGT AATTCCTCTT GGAATTTGCC
 7201 CTTTGTGAGT TTGGATCTTG GTTCAATCTC AAGCCTCAGA CAGTGGTTTCA AAGTTTCTTCT CTTCCATTTC AGGTGTCGTG AAAACTACCC CTAAGAGCCA
 7301 AAT

序列表

<110> 博尔托拉制药公司 (PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 用于因子 XA 抑制剂的解毒剂的单位剂量制剂及其使用方法

<130> 070545-1960

<140> PCT/US2010/042015

<141> 2010-07-14

<150> 61/225,887

<151> 2009-07-15

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 488

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

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

[0001]

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

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

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

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

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

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

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

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

	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	
	145					150					155					160	
	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly	Pro	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	
					165					170					175		
	Leu	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Gln	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	
					180					185					190		
	Glu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Trp	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ala	Asp	Leu	
			195					200					205				
	Asp	Pro	Thr	Glu	Asn	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Asp	Phe	Asn	Gln	Thr	Gln	
		210					215					220					
	Pro	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	
	225					230					235					240	
	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	
					245					250					255		
[0002]	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	
				260					265					270			
	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg	Val	
		275							280					285			
	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	
		290					295						300				
	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	
	305					310					315					320	
	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	
					325					330					335		
	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	
				340						345				350			
	Leu	Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	
		355						360					365				
	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	
		370					375					380					

Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln
385 390 395 400

Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln
405 410 415

Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe
420 425 430

Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys
435 440 445

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

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

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
485

[0003]

<210> 2

<211> 1560

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

gacttttctc cagcagcctg tcccagttag gacagggaca cagtactcgg ccacaccatg 60

gggcgccac tgcacctcgt cctgctcagt gcctccctgg ctggcctcct gctgctcggg 120

gaaagtctgt tcatccgcag ggagcagccc aacaacatcc tggcgagggt cacgagggcc 180

aattcctttc ttgaagagat gaagaaagga cacctcgaaa gagagtgcac ggaagagacc 240

tgctcatcag aagaggcccg cgaggtcttt gaggacagcg acaagacgaa tgaattcttg 300

aataaataca aagatggcga ccagtgtgag accagtcctt gccagaacca gggcaaatgt 360

aaagacggcc tcggggaata cacctgcacc tgtttagaag gattcgaagg caaaaactgt 420

gaattattca cacggaagct ctgcagcctg gacaacgggg actgtgacca gttctgccac 480

gaggaacaga actctgtggt gtgctcctgc gcccggggt acaccctggc tgacaacggc 540

aaggcctgca tccccacagg gccctacccc tgtgggaaac agaccctgga acgcaggaag 600

aggtcagtgg cccagggcac cagcagcagc ggggaggccc ctgacagcat cacatggaag 660

ccatatgatg cagccgacct ggacccacc gagaaccctc tcgacctgct tgacttcaac 720

	Asp	Gln	Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	
				100					105							110	
	Arg	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly	
			115						120							125	
	Pro	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	
			130						135							140	
	Ala	Gln	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Trp	
	145						150					155				160	
	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ala	Asp	Leu	Asp	Pro	Thr	Glu	Asn	Pro	Phe	Asp	
					165						170					175	
	Leu	Leu	Asp	Phe	Asn	Gln	Thr	Gln	Pro	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu	
				180						185						190	
	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	
			195							200						205	
[0005]	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	
		210							215							220	
	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	
	225								230							240	
	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	
					245						250					255	
	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	
					260						265					270	
	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	
				275							280					285	
	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	
			290								295					300	
	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	
	305								310							320	
	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	
					325							330				335	

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu
340 345 350

Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp
355 360 365

Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
370 375 380

Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
385 390 395 400

Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr
405 410 415

Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro
420 425 430

Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
435 440 445

[0006]

<210> 4

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 4

Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys
1 5 10 15

Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe
20 25 30

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp
35 40 45

Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val
50 55 60

Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys
65 70 75 80

	Ile	Pro	Thr	Gly	Pro	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Ile	
					85					90						95	
	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	
				100					105					110			
	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	
			115					120					125				
	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	
		130					135					140					
	Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	
	145					150					155					160	
	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	
				165						170					175		
	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	
			180					185						190			
[0007]	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	
			195					200					205				
	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	
		210					215					220					
	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Leu	Lys	Met	
	225					230				235					240		
	Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	
				245						250				255			
	Phe	Ile	Ile	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	
		275						280					285				
	Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	
		290					295					300					
	Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	
	305					310					315				320		

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys
325 330 335

Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
340 345

<210> 5

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 5

Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys
1 5 10 15

Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu
20 25 30

Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn
35 40 45

[0008]

Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys
50 55 60

Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val
85 90 95

Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu
100 105 110

Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu
115 120 125

Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe
130 135 140

Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu
145 150 155 160

Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys
165 170 175

Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile
180 185 190

Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp
195 200 205

Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe
210 215 220

Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu
225 230 235 240

Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe
245 250 255

Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu
260 265 270

[0009]

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys
275 280 285

Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala
290 295 300

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

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser
325 330 335

His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
340 345

<210> 6

<211> 393

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 6

	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Glu	Glu	Met	Lys	Lys	Gly	His	Leu	Glu	Arg	Glu
	1				5					10					15	
	Cys	Met	Glu	Glu	Thr	Cys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu
				20					25					30		
	Asp	Ser	Asp	Lys	Thr	Asn	Glu	Phe	Trp	Asn	Lys	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asp
			35					40					45			
	Gln	Cys	Glu	Thr	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Lys	Asp	Gly
		50					55					60				
	Leu	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn
	65					70					75					80
	Cys	Glu	Leu	Phe	Thr	Arg	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Cys
					85				90					95		
	Asp	Gln	Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala
				100					105					110		
[0010]	Arg	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly
			115					120					125			
	Pro	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln
		130					135						140			
	Glu	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu
	145					150				155						160
	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile
				165					170					175		
	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg
				180					185					190		
	Val	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His
		195					200						205			
	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr
		210					215					220				
	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg
	225					230				235						240

Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser
245 250 255

Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr
260 265 270

His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro
275 280 285

Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr
290 295 300

Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys
305 310 315 320

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr
325 330 335

Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly
340 345 350

[0011]

Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp
355 360 365

Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro
370 375 380

Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
385 390

<210> 7

<211> 393

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释-“对人工序列的描述:合成多肽”

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6).. (7)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14).. (14)

<223> γ-羧基谷氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16).. (16)
 <223> γ-羧基谷氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19).. (20)
 <223> γ-羧基谷氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25).. (26)
 <223> γ-羧基谷氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29).. (29)
 <223> γ-羧基谷氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32).. (32)
 <223> γ-羧基谷氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39).. (39)
 <223> γ-羧基谷氨酸
 <400> 7
 Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Met Lys Lys Gly His Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Met Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa
 20 25 30
 Asp Ser Asp Lys Thr Asn Xaa Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
 50 55 60
 Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
 65 70 75 80
 Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
 85 90 95
 Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
 100 105 110

	Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly	
	115	120 125
	Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val Gly Gly Gln	
	130	135 140
	Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu	
	145	150 155 160
	Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile	
	165	170 175
	Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg	
	180	185 190
	Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His	
	195	200 205
	Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr	
	210	215 220
[0013]	Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg	
	225	230 235 240
	Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser	
	245	250 255
	Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr	
	260	265 270
	His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro	
	275	280 285
	Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr	
	290	295 300
	Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys	
	305	310 315 320
	Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr	
	325	330 335
	Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly	

340

345

350

Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp
355 360 365

Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro
370 375 380

Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
385 390

<210> 8

<211> 139

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6).. (7)

<223> γ-羧基谷氨酸

[0014]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14).. (14)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16).. (16)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19).. (20)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25).. (26)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29).. (29)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32).. (32)

<223> γ-羧基谷氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39).. (39)
<223> γ -羧基谷氨酸

<400> 8
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Met Lys Lys Gly His Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

Cys Met Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa
20 25 30

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Xaa Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95

[0015]

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg
130 135

<210> 9
<211> 254
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9
Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
20 25 30

Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125

Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
130 135 140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160

[0016]

Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
165 170 175

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

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
195 200 205

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
225 230 235 240

Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
245 250

<210> 10

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (280).. (280)
<223> 脱氢丙氨酸

<400> 10
Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys
1 5 10 15

Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe
20 25 30

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp
35 40 45

Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val
50 55 60

[0017]

Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys
65 70 75 80

Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile
85 90 95

Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
100 105 110

Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser
115 120 125

Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg
130 135 140

Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly
145 150 155 160

Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr
165 170 175

Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro
180 185 190

Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp
195 200 205

Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly
210 215 220

Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met
225 230 235 240

Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser
245 250 255

Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln
260 265 270

Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe
275 280 285

Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
290 295 300

[0018]

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

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys
325 330 335

Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
340 345

<210> 11

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 11

Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys
1 5 10 15

Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu
20 25 30

Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn

	35	40	45
	Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys		
	50	55	60
	Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile		
	65	70	75 80
	Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val		
	85	90	95
	Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu		
	100	105	110
	Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu		
	115	120	125
	Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe		
	130	135	140
[0019]	Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu		
	145	150	155 160
	Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys		
	165	170	175
	Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile		
	180	185	190
	Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp		
	195	200	205
	Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe		
	210	215	220
	Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu		
	225	230	235 240
	Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe		
	245	250	255
	Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu		
	260	265	270

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys
275 280 285

Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala
290 295 300

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

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser
325 330 335

His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
340 345

<210> 12

<211> 365

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

[0020]

<400> 12

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys
1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly
20 25 30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu
35 40 45

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

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly
65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr
85 90 95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile
100 105 110

Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu

	115	120	125	
	Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser			
	130	135	140	
	Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg			
	145	150	155	160
	Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly			
	165	170	175	
	Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr			
	180	185	190	
	Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro			
	195	200	205	
	Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp			
	210	215	220	
[0021]	Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly			
	225	230	235	240
	Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met			
	245	250	255	
	Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser			
	260	265	270	
	Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln			
	275	280	285	
	Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe			
	290	295	300	
	Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys			
	305	310	315	320
	Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu			
	325	330	335	
	Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys			
	340	345	350	

Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
355 360 365

<210> 13

<211> 359

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 13

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys
1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly
20 25 30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu
35 40 45

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

[0022]

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly
65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr
85 90 95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys
100 105 110

Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn
115 120 125

Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr
130 135 140

Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly
145 150 155 160

Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val
165 170 175

Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe

	180	185	190
	Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn		
	195	200	205
	Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu		
	210	215	220
	Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu		
	225	230	235 240
	Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val		
	245	250	255
	Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn		
	260	265	270
	Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly		
	275	280	285
	Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val		
	290	295	300
[0023]	Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr		
	305	310	315 320
	Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser		
	325	330	335
	Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val		
	340	345	350
	Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys		
	355		

<210> 14

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 14

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys
1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly
20 25 30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu
35 40 45

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

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly
65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr
85 90 95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg
100 105

<210> 15

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

[0024]

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 15

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
20 25 30

Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125

Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
130 135 140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160

Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
165 170 175

Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg
180 185 190

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
195 200 205

[0025]

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
225 230 235 240

Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
245 250

<210> 16

<211> 1218

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1215)

<400> 16

atg ggg cgc cca ctg cac ctc gtc ctg ctc agt gcc tcc ctg gct ggc
Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
1 5 10 15

48

	ctc ctg ctg ctc ggg gaa agt ctg ttc atc cgc agg gag cag gcc aac Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn 20 25 30	96
	aac atc ctg gcg agg gtc acg agg gcc aat tcc ttt ctt ttc tgg aat Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn 35 40 45	144
	aaa tac aaa gat ggc gac cag tgt gag acc agt cct tgc cag aac cag Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln 50 55 60	192
	ggc aaa tgt aaa gac ggc ctc ggg gaa tac acc tgc acc tgt tta gaa Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu 65 70 75 80	240
	gga ttc gaa ggc aaa aac tgt gaa tta ttc aca cgg aag ctc tgc agc Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser 85 90 95	288
	ctg gac aac ggg gac tgt gac cag ttc tgc cac gag gaa cag aac tct Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser 100 105 110	336
	gtg gtg tgc tcc tgc gcc cgc ggg tac acc ctg gct gac aac ggc aag Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys 115 120 125	384
[0026]	gcc tgc att ccc aca ggg ccc tac ccc tgt ggg aaa cag acc ctg gaa Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu 130 135 140	432
	cgc agg aag agg agg aag agg atc gtg gga ggc cag gaa tgc aag gac Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp 145 150 155 160	480
	ggg gag tgt ccc tgg cag gcc ctg ctc atc aat gag gaa aac gag ggt Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly 165 170 175	528
	ttc tgt ggt gga acc att ctg agc gag ttc tac atc cta acg gca gcc Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala 180 185 190	576
	cac tgt ctc tac caa gcc aag aga ttc aag gtg agg gta ggg gac cgg His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg 195 200 205	624
	aac acg gag cag gag gag gcc ggt gag gcg gtg cac gag gtg gag gtg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val 210 215 220	672
	gtc atc aag cac aac cgg ttc aca aag gag acc tat gac ttc gac atc Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile 225 230 235 240	720
	gcc gtg ctc cgg ctc aag acc ccc atc acc ttc cgc atg aac gtg gcg Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala	768

	245	250	255	
	cct gcc tgc ctc ccc gag cgt gac tgg gcc gag tcc acg ctg atg acg			816
	Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr			
	260	265	270	
	cag aag acg ggg att gtg agc ggc ttc ggg cgc acc cac gag aag ggc			864
	Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly			
	275	280	285	
	cgg cag tcc acc agg ctc aag atg ctg gag gtg ccc tac gtg gac cgc			912
	Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg			
	290	295	300	
	aac agc tgc aag ctg tcc agc agc ttc atc atc acc cag aac atg ttc			960
	Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe			
	305	310	315	320
	tgt gcc ggc tac gac acc aag cag gag gat gcc tgc cag ggg gac gca			1008
	Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala			
	325	330	335	
	ggg ggc ccg cac gtc acc cgc ttc aag gac acc tac ttc gtg aca ggc			1056
	Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly			
	340	345	350	
	atc gtc agc tgg gga gag ggc tgt gcc cgt aag ggg aag tac ggg atc			1104
	Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile			
	355	360	365	
[0027]	tac acc aag gtc acc gcc ttc ctc aag tgg atc gac agg tcc atg aaa			1152
	Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys			
	370	375	380	
	acc agg ggc ttg ccc aag gcc aag agc cat gcc ccg gag gtc ata acg			1200
	Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr			
	385	390	395	400
	tcc tct cca tta aag tga			1218
	Ser Ser Pro Leu Lys			
	405			
	<210> 17			
	<211> 6			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<221> 来源			
	<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"			
	<400> 17			
	Arg Lys Arg Arg Lys Arg			
	1	5		
	<210> 18			
	<211> 7303			

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"	
<400> 18	
tctagacaca gtactcggcc acaccatggg gcgccactg cacctcgtcc tgctcagtgc	60
ctccctggct ggccctcctgc tgctcgggga aagtctgttc atccgcaggg agcaggccaa	120
caacatcctg gcgagggtca cgagggccaa ttcctttctt ttctggaata aatacaaaga	180
tggcgaccag tgtgagacca gtcccttgcca gaaccagggc aaatgtaaag acggcctcgg	240
ggaatacacc tgcacctgtt tagaaggatt cgaaggcaaa aactgtgaat tattcacag	300
gaagctctgc agcctggaca acggggactg tgaccagttc tgccacgagg aacagaactc	360
tgtgggtgtc tccctgcgcc gcgggtacac cctggctgac aacggcaagg cctgcattcc	420
cacagggcc taccctgtg ggaacagac cctggaacgc aggaagagga ggaagaggat	480
cgtgggaggc caggaatgca aggacgggga gtgtccctgg caggccctgc tcatcaatga	540
ggaaaacgag ggtttctgtg gtggaacct tctgagcgag ttctacatcc taacggcagc	600
ccactgtctc taccaaagcca agagattcaa ggtgagggtg ggggaccgga acacggagca	660
ggaggagggc ggtgaggcgg tgcacgaggt ggagggtgct atcaagcaca accggttcac	720
aaaggagacc tatgacttcg acatcgccgt gctccggctc aagaccccca tcaccttcg	780
catgaacgtg gcgcctgcct gccctcccga gcgtgactgg gccgagtcca cgctgatgac	840
gcagaagacg gggattgtga gcggcttcgg gcgcaccac gagaagggcc ggcagtccac	900
caggctcaag atgctggagg tgccctacgt ggaccgcaac agctgcaagc tgtccagcag	960
cttcatcacc accagaaca tgttctgtgc cggtacgac accaagcagg aggatgcctg	1020
ccagggggac gcagggggcc cgcacgtcac ccgttcaag gacacctact tegtacagc	1080
catcgtcagc tggggagagg gctgtgccg taagggaag tacgggatct acaccaaggt	1140
caccgccttc ctcaagtga tcgacaggtc catgaaaacc aggggcttgc ccaaggccaa	1200
gagccatgcc ccggaggtea taacgtcctc tccattaaag tgagatecca ctcggatccc	1260
tattctatag tgtcacctaa atgctagagc tcgtgatca gcctcgactg tgccttctag	1320
ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac	1380
tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca	1440
ttctattctg gggggtggg tgggacagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag	1500
caggcatgct ggggatgcgg tgggtcttat ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg	1560

[0028]

	ctcagagcgge cgccccctct gaggcggaaa gaaccagctg tggaatgtgt gtcagttagg	1620
	gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta	1680
	gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat	1740
	gcattctaat tagtcageaa ccatagtccc gccctaact ccgcccatac cgcacctaac	1800
	tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccga tggctgacta atttttttta tttatgcaga	1860
	ggccgagggc gcctcgccct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg	1920
	cctaggcttt tgcaaaaaag ctagcttccc gctgcatca tggttcgacc attgaactgc	1980
	atcgtcgccg tgtcccaaaa tatggggatt ggcaagaacg gagacctacc ctggcctccg	2040
	ctcaggaacg agttcaagta cttccaaaga atgaccacaa cctcttcagt ggaaggtaaa	2100
	cagaatctgg tgattatggg taggaaaacc tggttctcca ttcctgagaa gaatcgacct	2160
	ttaaaggaca gaattaatat agttctcagt agagaactca aagaaccacc acgaggagct	2220
	catlctcttg ccaaaagltt ggalgatgcc ttaagactta ttaacaacc ggaattggca	2280
	agtaaagtag acatggtttg gatagtcgga ggcagttctg tttaccagga agccatgaat	2340
	caaccagggc accttagact ctttgtgaca aggatcatgc aggaatttga aagtgcacag	2400
[0029]	tttttccag aaattgattt ggggaaatat aaacttctcc cagaataccc aggcgtcttc	2460
	tctgaggtec aggaggaaaa aggcatcaag tataagtttg aagtctacga gaagaaagac	2520
	taacaggaag atgctttcaa gttctctgct cccctctaa agctatgeat tttataaga	2580
	ccatgggact tttgctggct ttagatcccg cggagatcca gacatgataa gataattga	2640
	tgagtttga caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg	2700
	tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa	2760
	ttgcattcat tttatgttcc aggttcaggg ggagggtgtg gaggtttttt aaagcaagta	2820
	aaacctctac aaatgttgta tggctgatta tgagctccag cttttgttcc ctttagtgag	2880
	ggtaattgc gcgcttgcg taatcatggt catagctgtt tccgtgtgta aattgttacc	2940
	cgtcacaaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	3000
	aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttcc cagtcgggaa	3060
	acctgtcgtg ccagctgeat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	3120
	ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtgcg ctcggctcgtt cggctcggc	3180
	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc cacagaatca ggggataacg	3240
	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	3300

[0030]

tgetggcggtt tttecatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	3360
gtcagagggtg gcgaaaccgg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	3420
ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	3480
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cagctgttag gtatctcagt tcggtgtagg	3540
tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgtgcgcct	3600
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag	3660
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga	3720
agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatcgc gctctgctga	3780
agccagttac cttcgaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgtg	3840
gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaa ggatctcaag	3900
aaatecttt gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaac tcacgttaag	3960
ggattttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttta aattaaaaat	4020
gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct	4080
taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcacccata gttgcctgac	4140
tccccgtcgt glagataact acgalacggg agggcttacc atctggcccc agtgcgcaa	4200
tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg	4260
gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatecgc ctccatccag tctattaatt	4320
gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	4380
ttgtacagg catcgtgggt tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	4440
cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct	4500
tcggtctccc gatcgttgtc agaagtaagt tgccgcagc gttatcactc atggttatgg	4560
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgctttctc gtgactggtg	4620
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccggg	4680
cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgcct atcattggaa	4740
aacgtttctt ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	4800
aaccactcgt tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	4860
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaatgtt	4920
gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	4980
tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	5040
ttccccgaaa agtgcacctt gggaattgtt aaacgttaat attttgtaa aattcgcgtt	5100

	aaatTTTTgt taaatcagct cattTTTTaa ccaataggcc gaaatcggea aaatccctta	5160
	taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gaggTtTgtt ccagTttgga acaagagtcc	5220
	actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg	5280
	cccactagct gaaccatcac cctaataaag TTTTTgggg tcgaggTgcc gtaaagcact	5340
	aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt tagagcttga cggggaaagc cggcgaaact	5400
	ggcgagaaaag gaagggaaga aagcgaaagg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc	5460
	ggTcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgcttaat gcgcgcTac agggcgcgTc	5520
	ggccattcg ccatcagge Tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcggtgc gggcctcttc	5580
	gctattacgc cagctggcga aagggggatg Tgctgcaagg cgattaagtT gggtaacgcc	5640
	agggTTTTcc cagTcacgac gTgttaaaac gacggccagt gagegcgcgt aatacgactc	5700
	actatagggc gaattggaat taattcgctg ggctgagacc cgcagaggaa gacgctctag	5760
	ggatTtgTcc cggactagcg agatggcaag gctgaggacg ggaggctgat Tgagaggcga	5820
	aggtacaccc taatctcaat acaacccttg gagctaagcc agcaatggta gagggaagat	5880
	TctgcacgTc cctccagge ggctccccg Tcaccacca ccccaaccgc ccccgaccgg	5940
[0031]	agctgagagt aattcataca aaaggactcg cccctgcctt ggggaatccc agggaccgTc	6000
	gttaaactcc cactaacgta gaaccagag atcgctgcgt TcccgcTccc TcaccgcTcc	6060
	gctctcgTca TcactgaggT ggagaagagc atcgctgagg ctccggTgcc cgtcagTggg	6120
	cagagcgcac atgccccaca gTccccgaga agTtgggggg aggggtcggc aattgaaccg	6180
	gtgcctagag aaggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga Tgtcgtgtac Tggctccgc	6240
	TTTTTccga gggTggggga gaaccgtata taagtgcagt agTcgccgtg aacgtTcttt	6300
	Ttcgcaacgg gTttccgcgc agaacacagg taagtgcgt gTgtggtTcc cgcgggcctg	6360
	gcctctttac gggTtatggc cTttgcgtgc cTtgaattac TtccacgcTc ctggctgcag	6420
	Tacgtgattc Ttgatccga gTtcgggtt gaaagtgggt gggagagTtc gaggcctTgc	6480
	gcttaaggag cccctTcgcc Tcgtgcttga gTtgaggcct ggctTgggcg ctggggccgc	6540
	cgcgtgcgaa Tctggtggca cTtTcgccgc Tctctcgctg cTttcgataa gTctctagcc	6600
	atttaaaatt Tttgatgacc Tgctgcgacg cTttttTctt ggcaagatag Tcttgtaaat	6660
	gcgggccaag atctgcacac Tggtatttcg gTttttgggg cgcgggcgg cgacggggcc	6720
	cgtgcgtccc agcgcacatg Ttcggcgagg cggggcctgc gagegcggcc accgagaatc	6780
	ggacgggggt agTctcaagc Tggccggcct gctctggtgc ctggcctgc gccgccgtgt	6840

atgcccccgc cctgggcggc aaggttgccc cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga 6900
 tggccgcttc ccggccctgc tgcaggagac tcaaaatgga ggacgcggcg ctccggagag 6960
 cgggcgggtg agtcacccac acaaaggaaa agggcctttc cgtcctcagc cgtcgttca 7020
 tgtgactcca cggagtaccg ggcgcctcc aggcacctcg attagtctc gagcttttg 7080
 agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg ttttatgcga tggagtctcc ccacactgag 7140
 tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg cacttgatgt aattctcctt ggaatttgcc 7200
 ctttttgagt ttgatcttg gttcattctc aagcctcaga cagtggttca aagtttttt 7260
 cttccatttc aggtgtcgtg aaaactaccc ctaaaagcca aat 7303

<210> 19

<211> 405

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述:合成多肽"

<400> 19

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly

[0032]

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn

20 25 30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn

35 40 45

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln

50 55 60

Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu

65 70 75 80

Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser

85 90 95

Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser

100 105 110

Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys

115 120 125

	Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu	
	130	140
	Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp	
	145	160
	Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly	
	165	175
	Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala	
	180	190
	His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg	
	195	205
	Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val	
	210	220
	Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile	
	225	240
[0033]	Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala	
	245	255
	Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr	
	260	270
	Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly	
	275	285
	Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg	
	290	300
	Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe	
	305	320
	Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala	
	325	335
	Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly	
	340	350
	Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile	
	355	365

	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Lys
	370						375				380					
[0034]	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr
	385					390				395					400	
	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys											
					405											

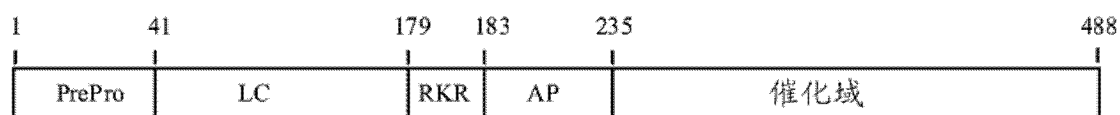


图 1

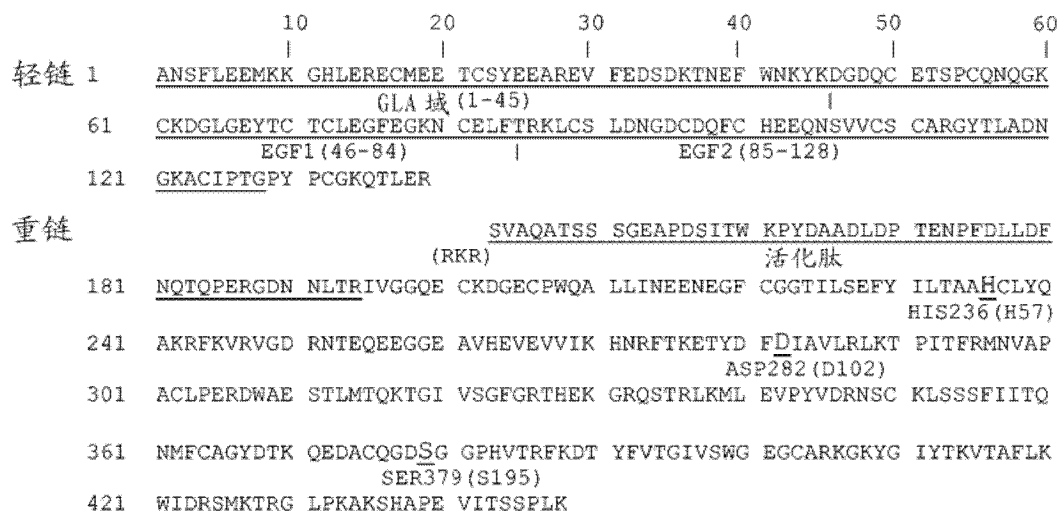


图 2

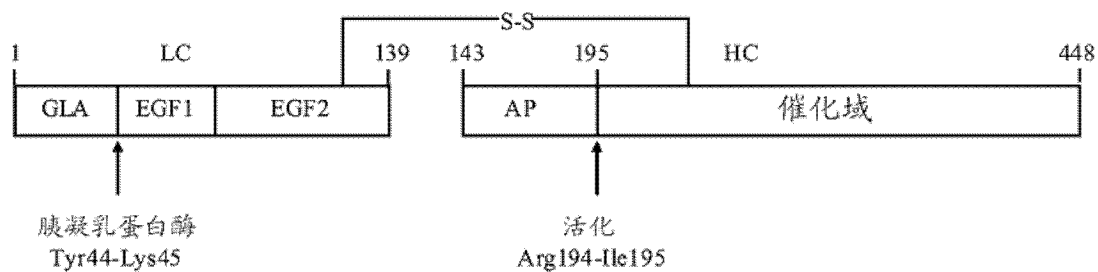


图 3

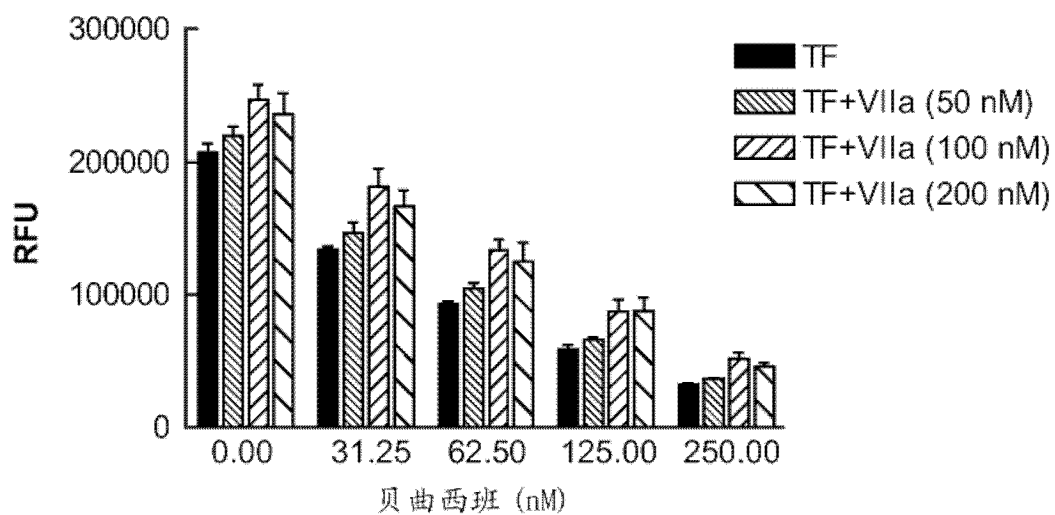


图4

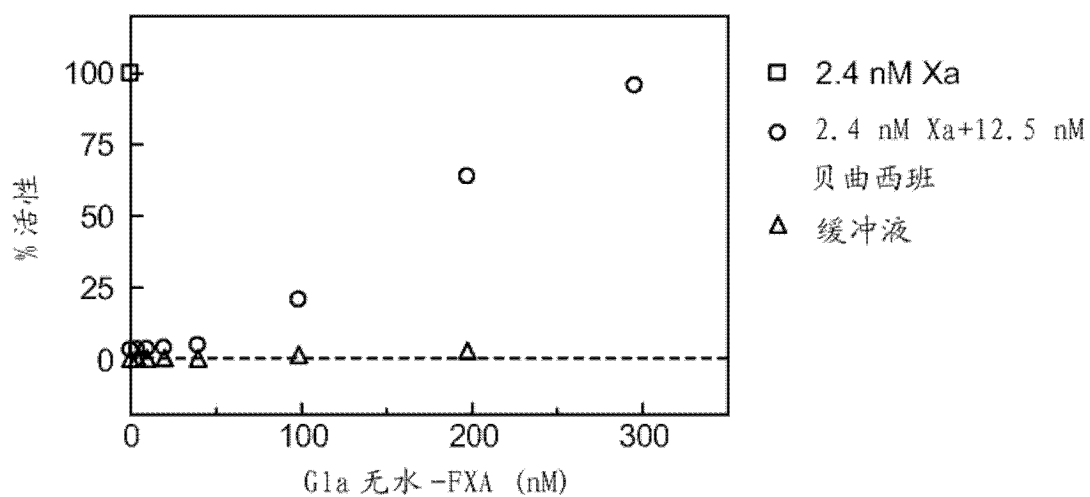


图5

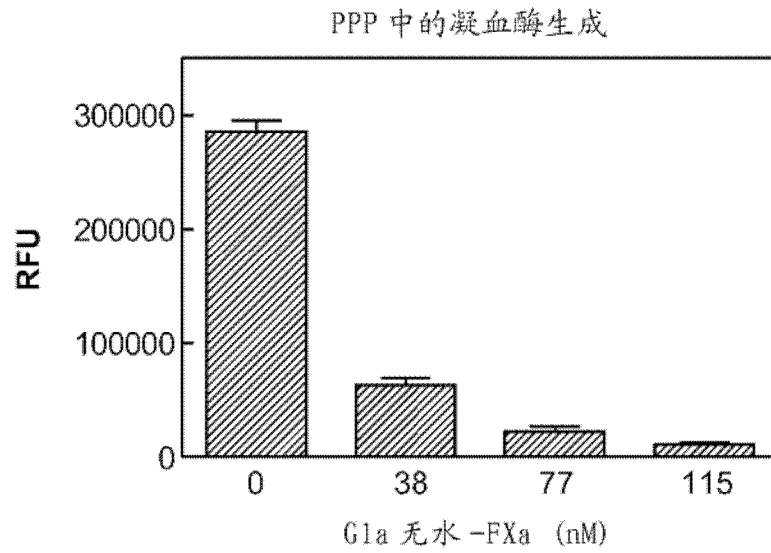


图6

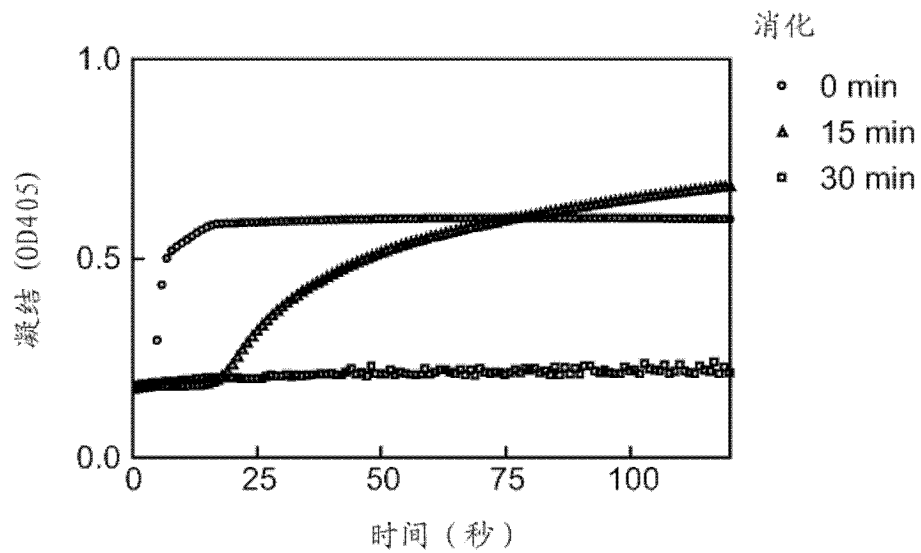


图7

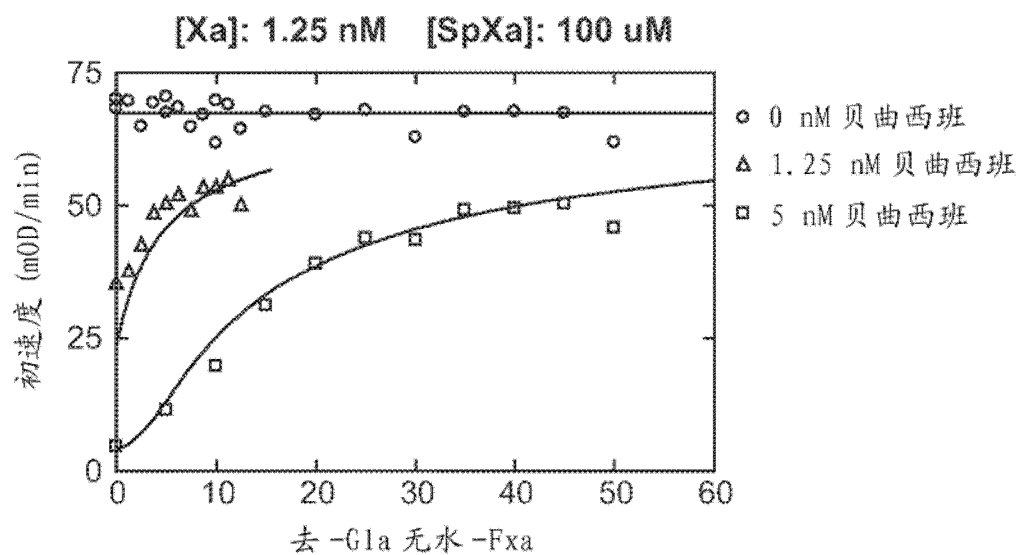


图8

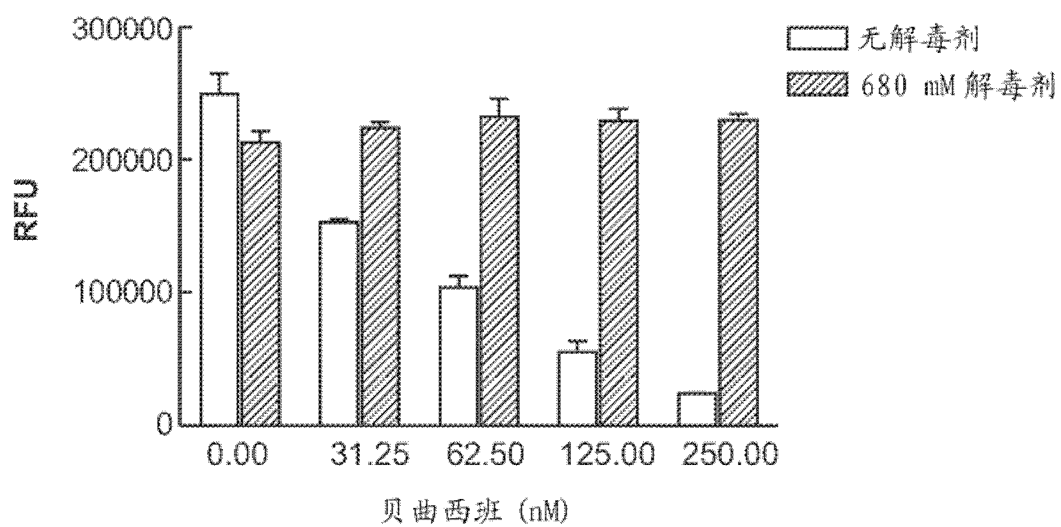


图9

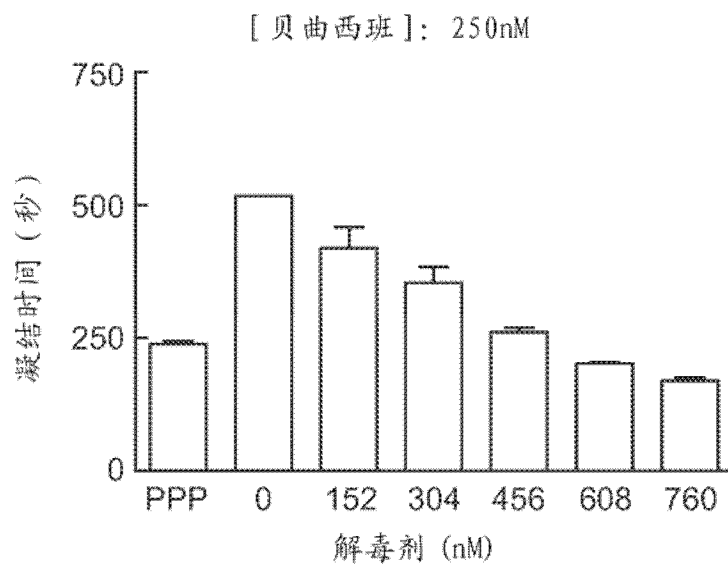


图10

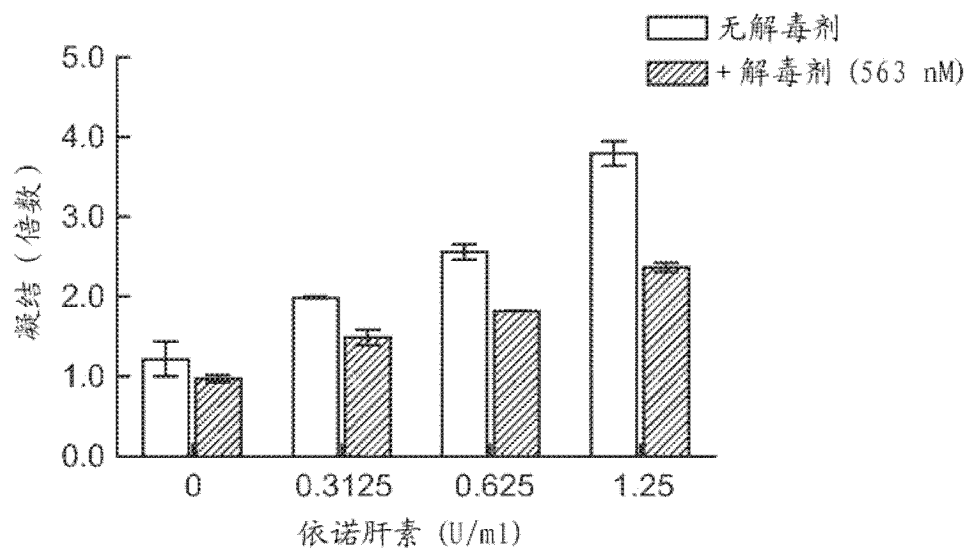


图11

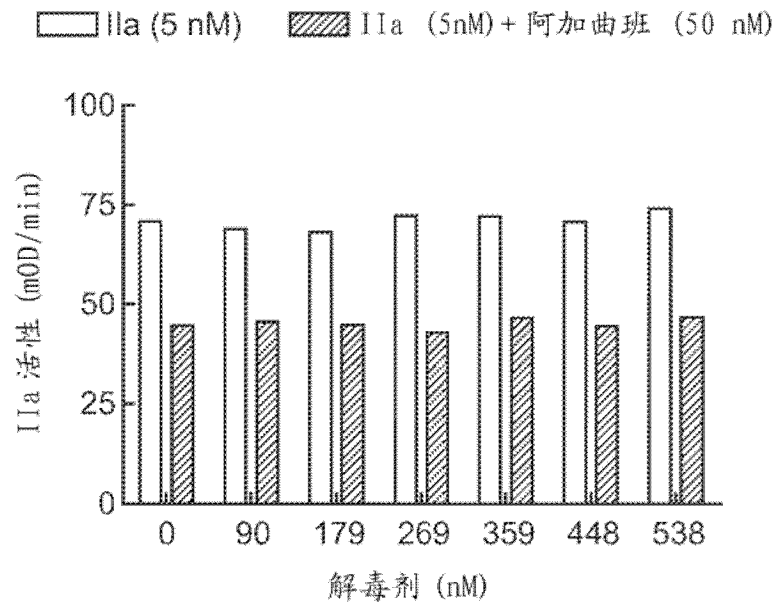


图12

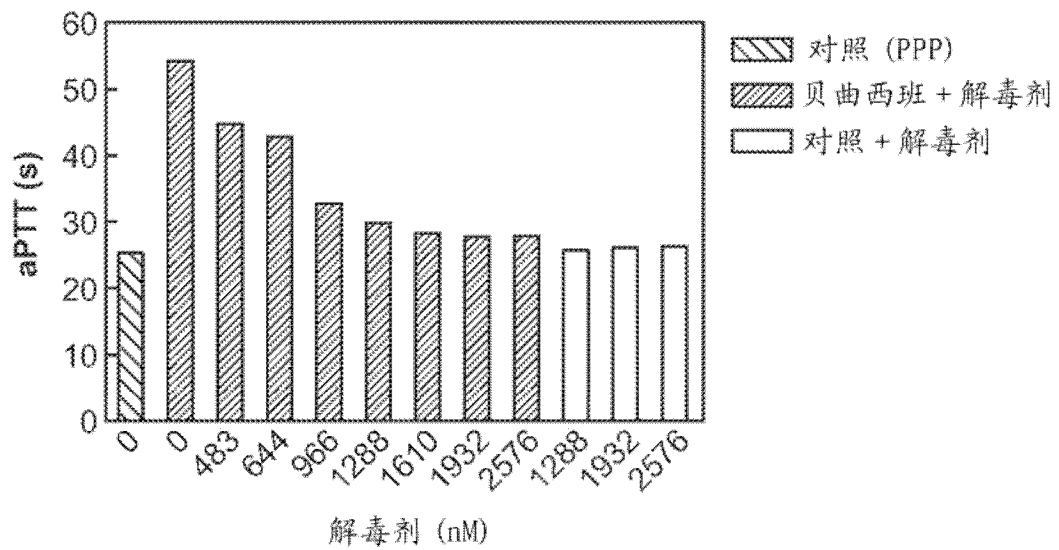


图13

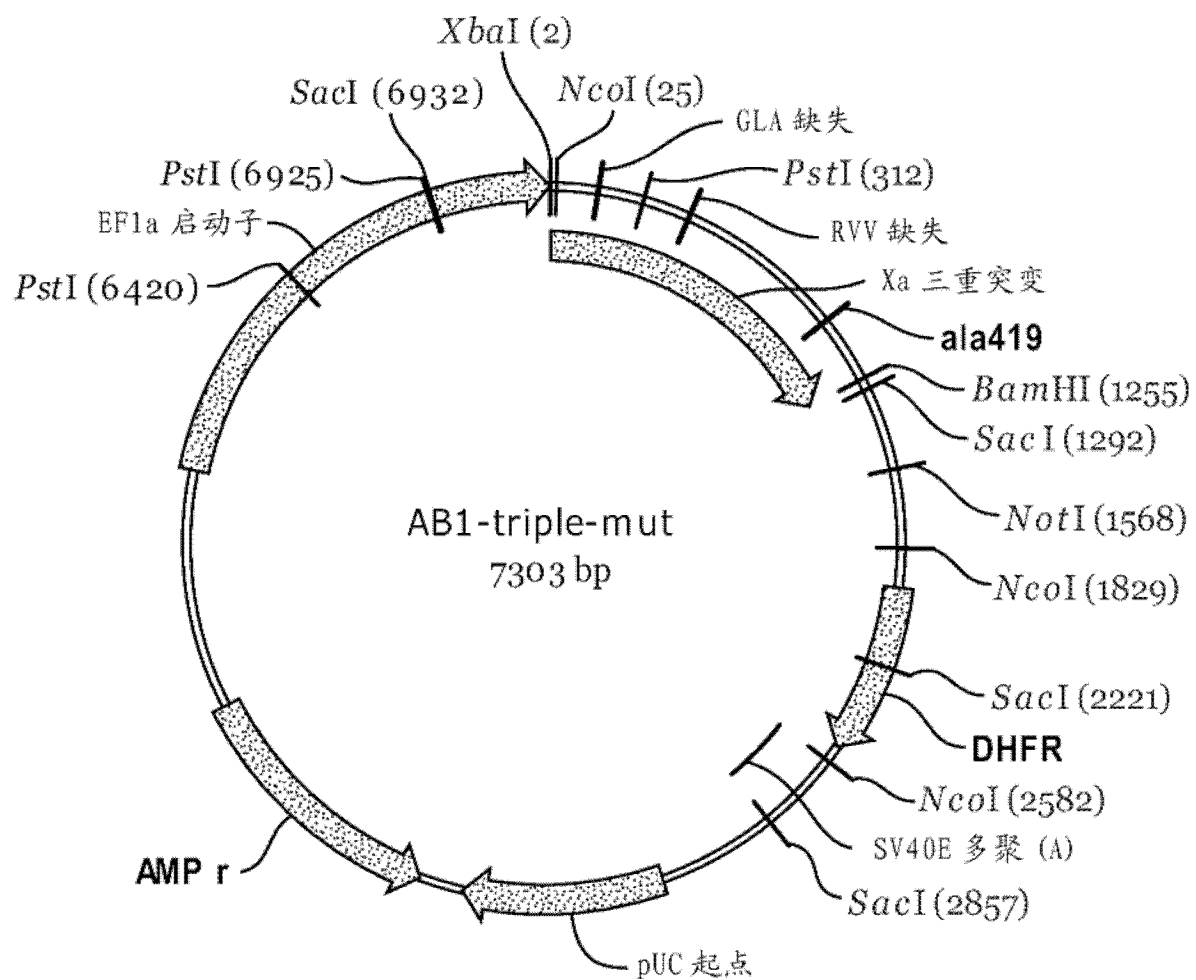


图14

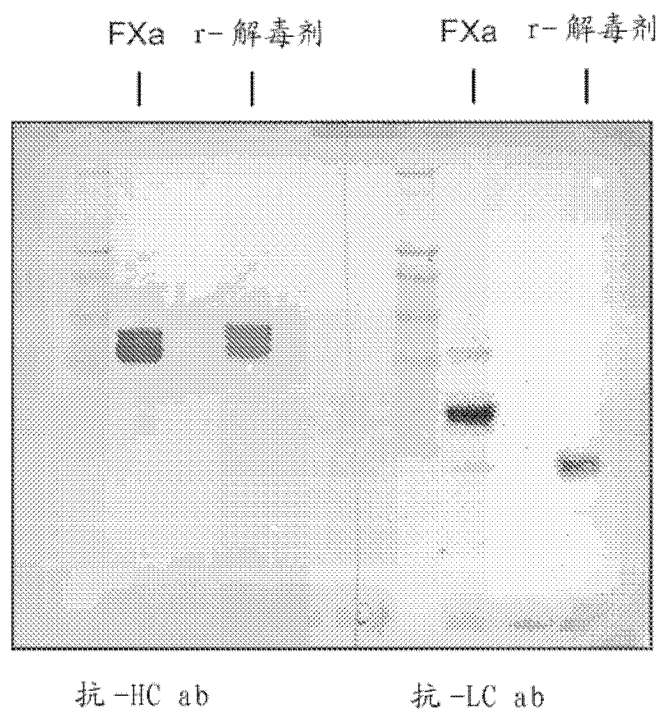


图15A

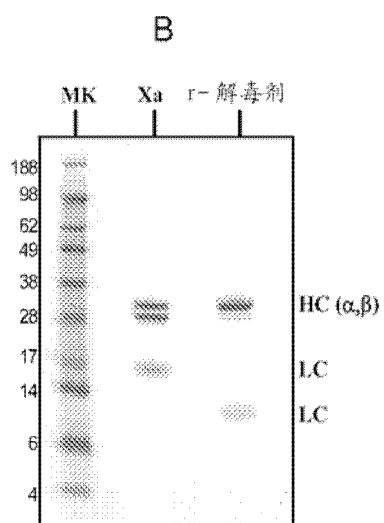


图15B

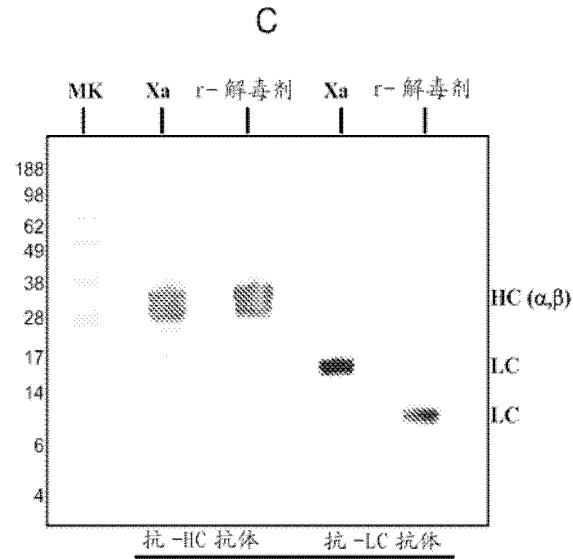


图15C

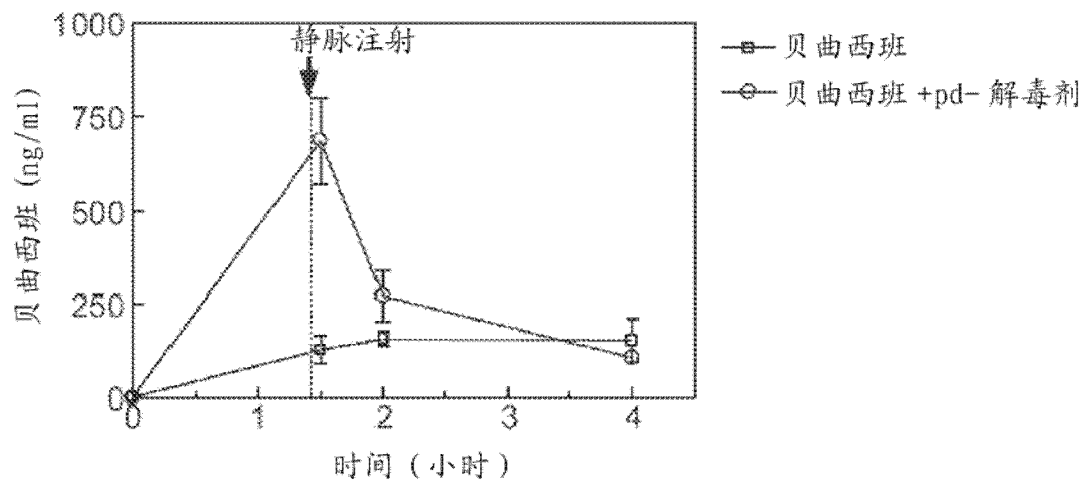


图16

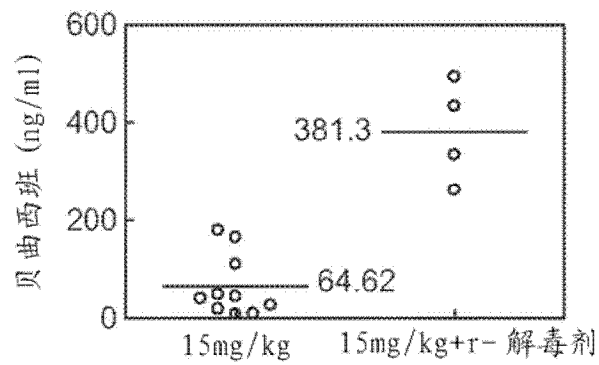


图17A

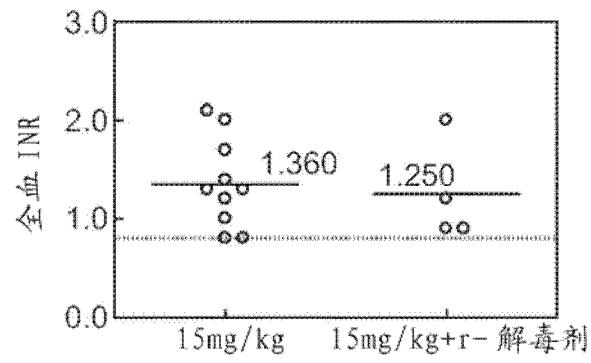


图17B

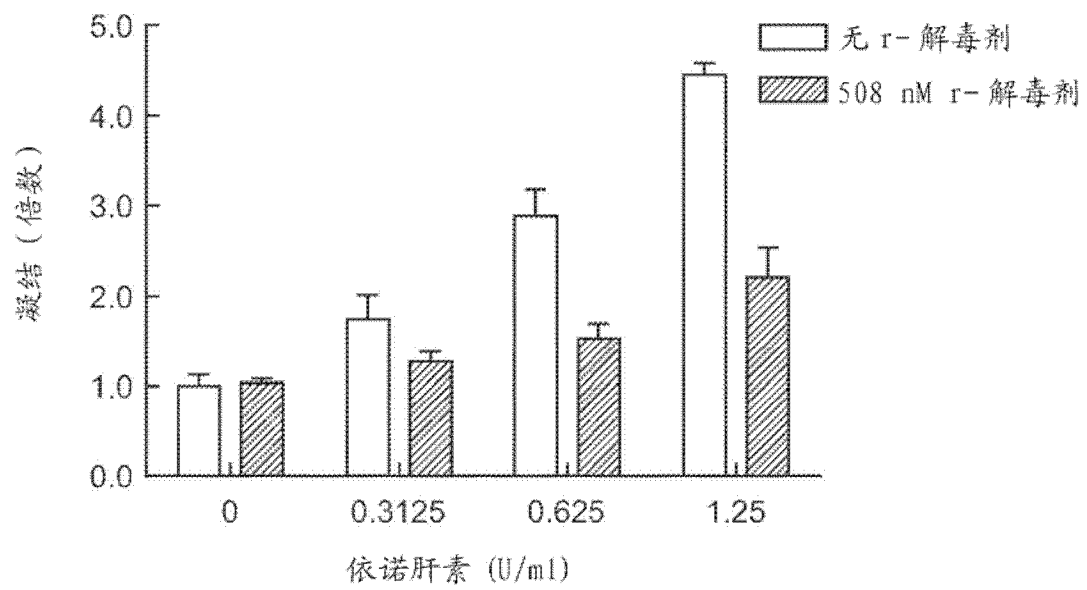


图18

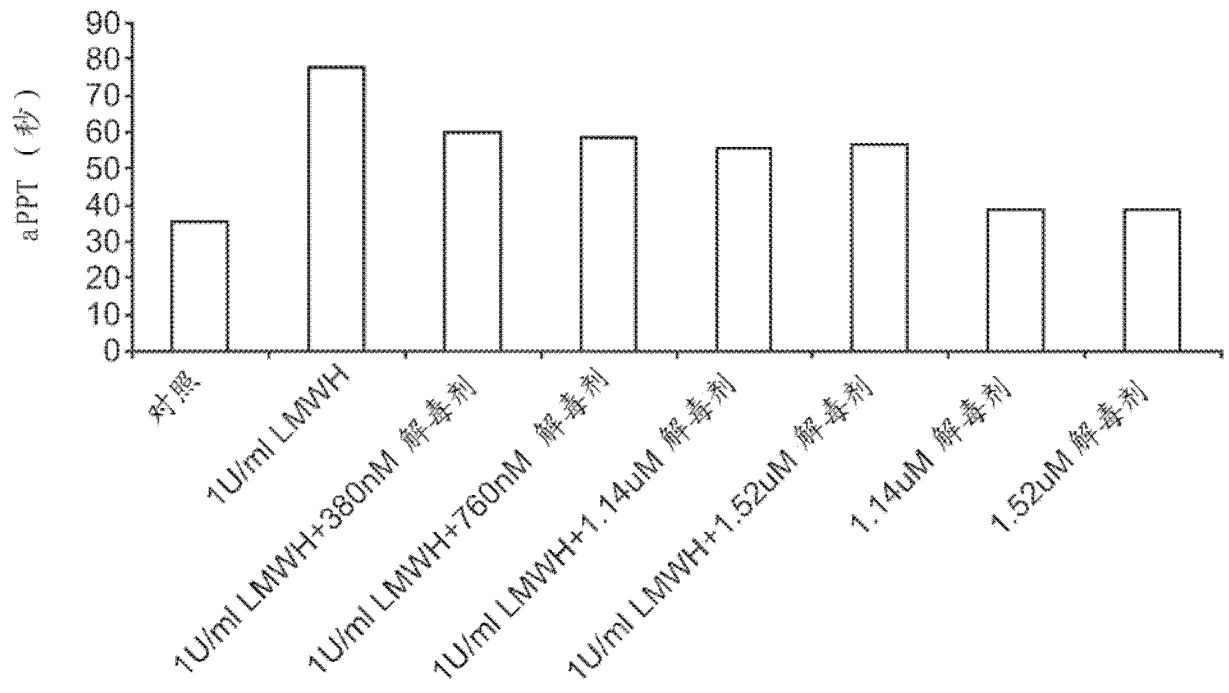


图19

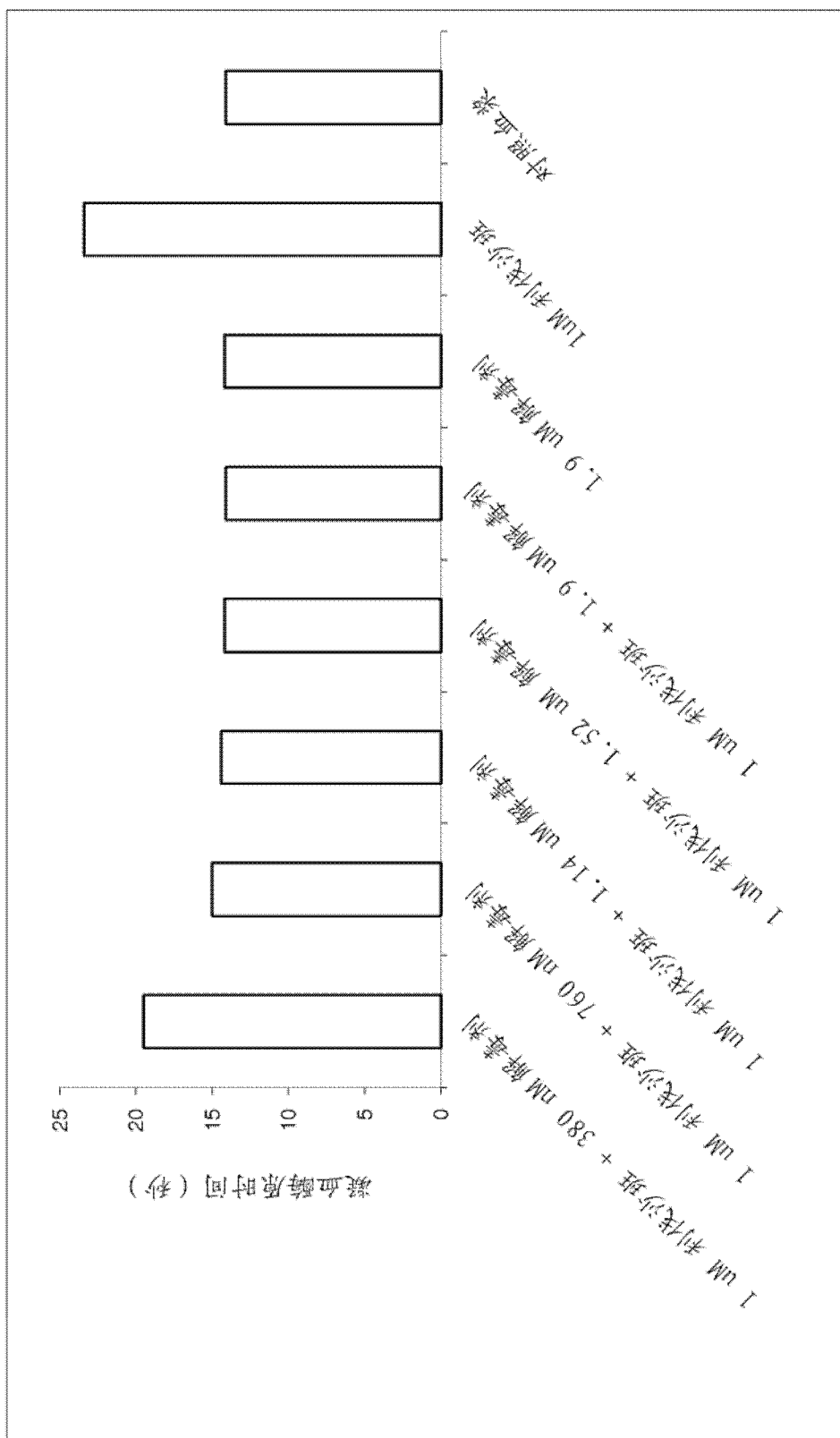


图20

atgggggogcccactgcacctcgctcctgctcagtgccctccctggctggcctcctgctgctc
M G R P L H L V L L S A S L A G L L L L
ggggaaagtctgttcatccgcagggagcaggccaacaacatcctggcgaggggtcacgagg
G E S L F I R R E Q A N N I L A R V T R
gccaattcctttcttttctggaataaatacaaaagatggcgaccagtggtgagaccagtcct
A N S F L F W N K Y K D G D Q C E T S P
tgccagaaccagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacacctgcacctgttttagaa
C Q N Q G K C K D G L G E Y T C T C L E
ggattcgaaggcaaaaactgtgaattattcacacggaagctctgcagcctggacaacggg
G F E G K N C E L F T R K L C S L D N G
gactgtgaccagttctgcccacgaggaacagaactctgtggtgtgctcctgcgcccgggg
D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G
tacacctggctgacaacggcaaggcctgcattcccacagggccctacctctgtgggaaa
Y T L A D N G K A C I P T G P Y P C G K
cagacctggaaacgcaggaagaggaggaaggatcggtgggagggccaggaatgcaaggac
Q T L E R R K R K R I V G G Q E C K D
ggggagtgctcctggcagggcctgctcatcaatgaggaaaacgaggggtttctgtggtgga
G E C P W Q A L L I N E E N E G F C G G
accattctgagcgagttctacatcctaacggcagcccactgtctctaccaagccaagaga
T I L S E F Y I L T A A H C L Y Q A K R
ttcaaggtgagggtaggggacgggaacacggagcaggaggagggcggtgagcggtgcac
F K V R V G D R N T E Q E E G G E A V H
gaggtggaggtggtcatcaagcacaacgggttcacaaaggagacctatgacttcgacatc
E V E V V I K H N R F T K E T Y D F D I
gccgtgctccggtcaagaccoccatcaccttcggcatgaacgtggcgccctgcctgcctc
A V L R L K T P I T F R M N V A P A C L
cccagagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggattgtgagcggc
P E R D W A E S T L M T Q K T G I V S G
ttcggggcgacccacgagaagggccggcagtcaccaggtcaagatgctggaggtgcc
F G R T H E K G R Q S T R L K M L E V P
tacgtggacggcaacagctgcaagctgtccagcagcttcacatcacccagaacatgttc
Y V D R N S C K L S S S F I I T Q N M F
tgtgcccgttacgacaccaagcaggaggatgcctgccagggggacgcagggggcccgac
C A G Y D T K Q E D A C Q G D A G G P H
gtcacccgcttcaaggacacctaacttcgtgacaggcatcgtcagctggggagagggctgt
V T R F K D T Y F V T G I V S W G E G C
gcccgtgaaggggaagtacgggatctacaccaaggtoaccgccttctcagtggtatcgac
A R K G K Y G I Y T K V T A F L K W I D
aggtccatgaaaaccaggggcttgcccaaggccaagagccatgccccggaggtcataacg
R S M K T R G L P K A K S H A P E V I T
tcctctccattaaagtga
S S P L K -

图21

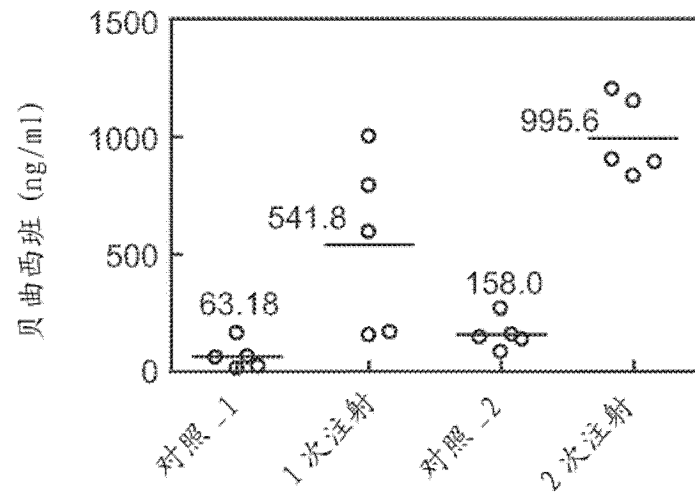


图22A

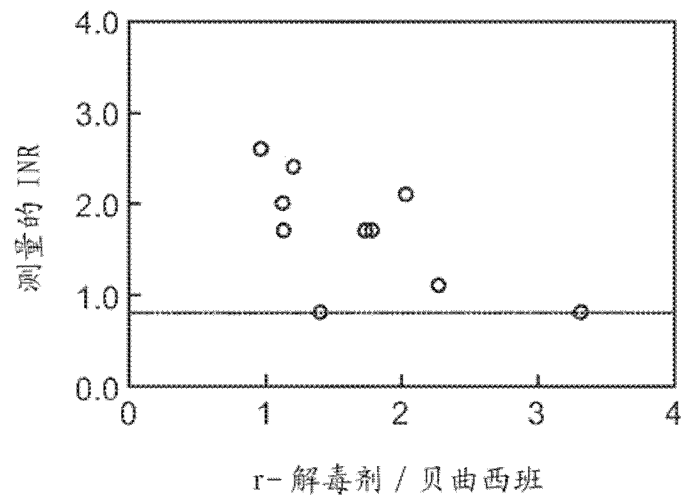


图22B

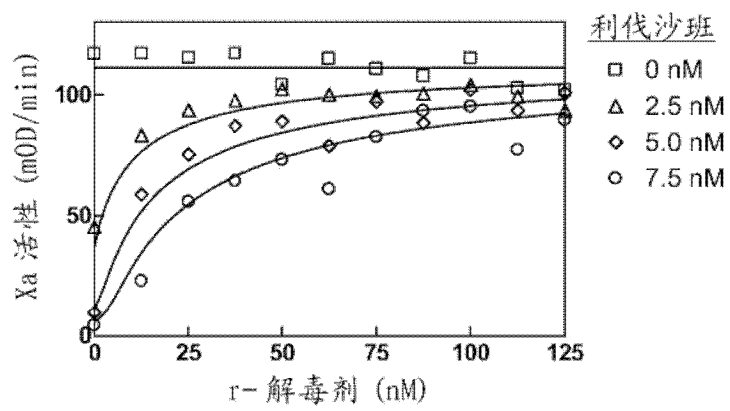


图23A

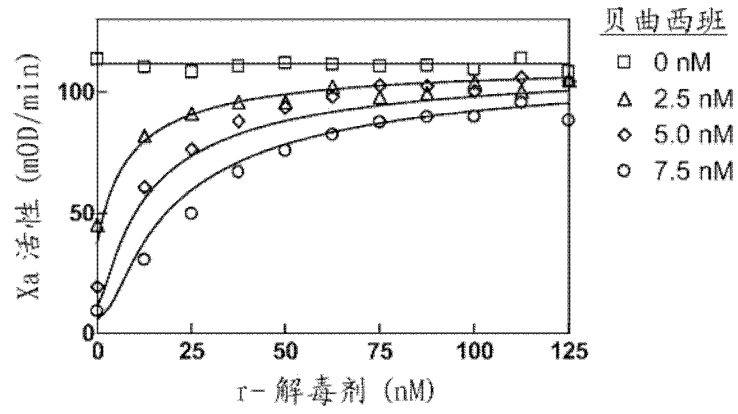


图23B

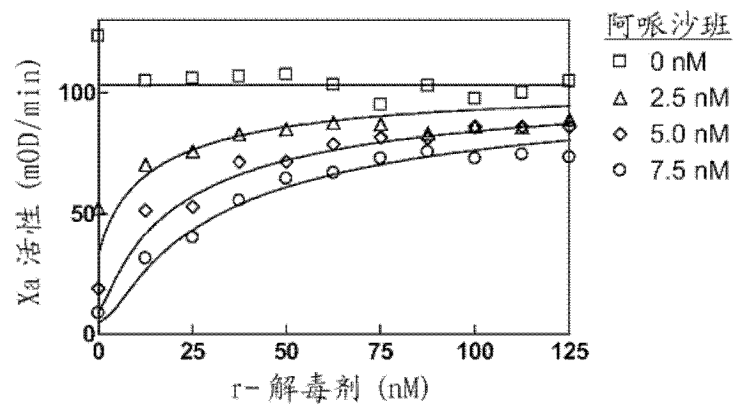


图23C

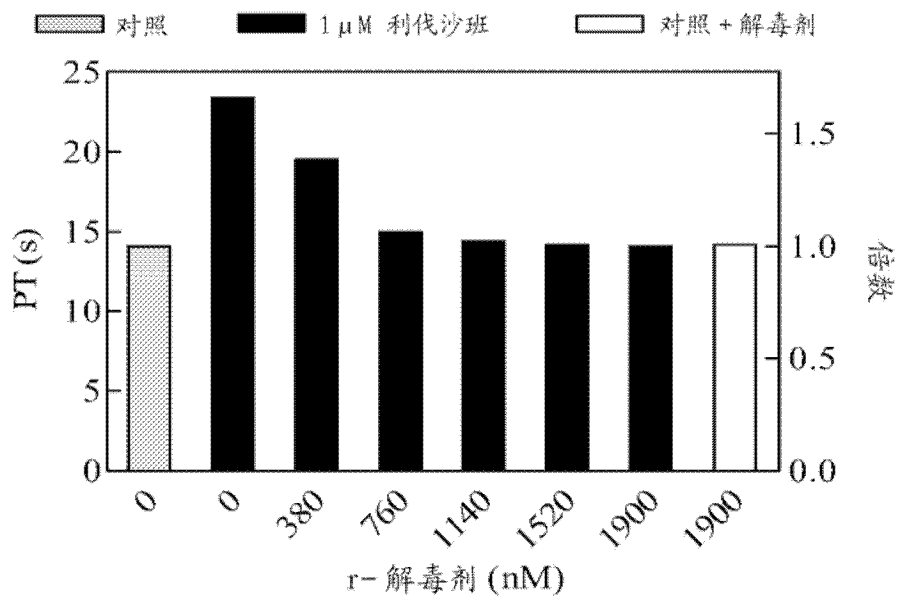


图24

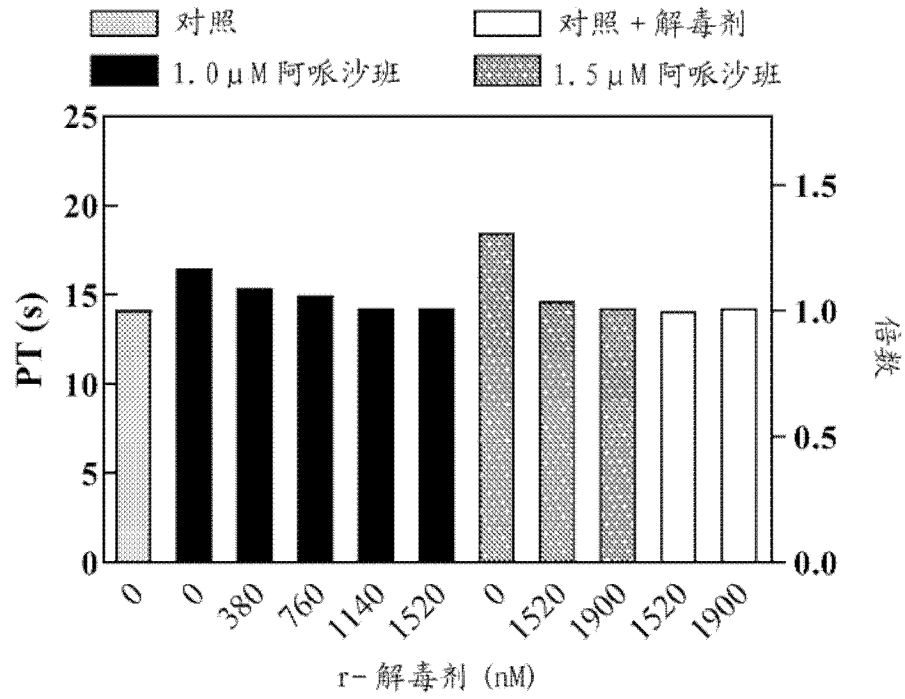


图25

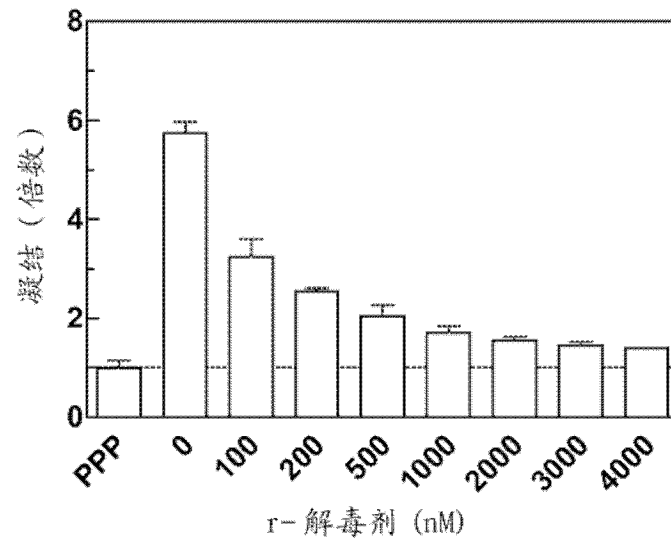


图26

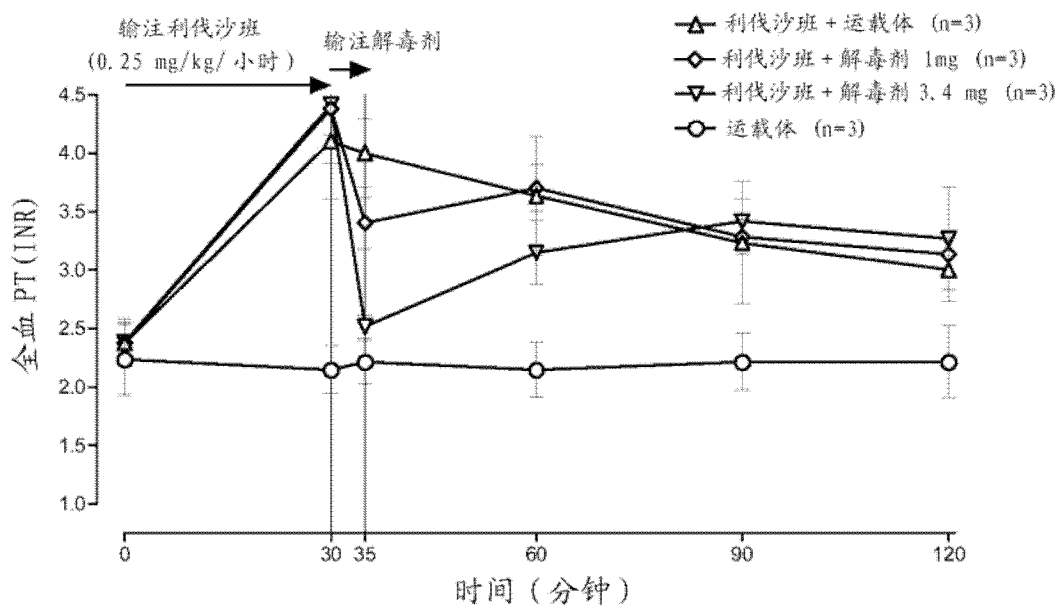


图27

利伐沙班的总血浆浓度和未结合的血浆浓度
 利伐沙班 (0.25 mg/kg/小时, IV) +/- 解毒剂 (1 和 3.4 mg, IV)
 (N = 3 每组)

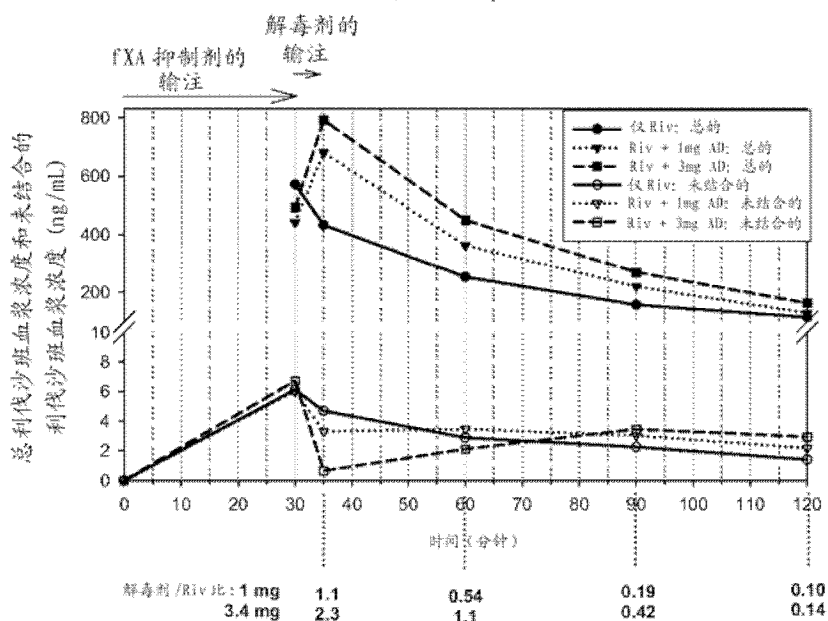


图28

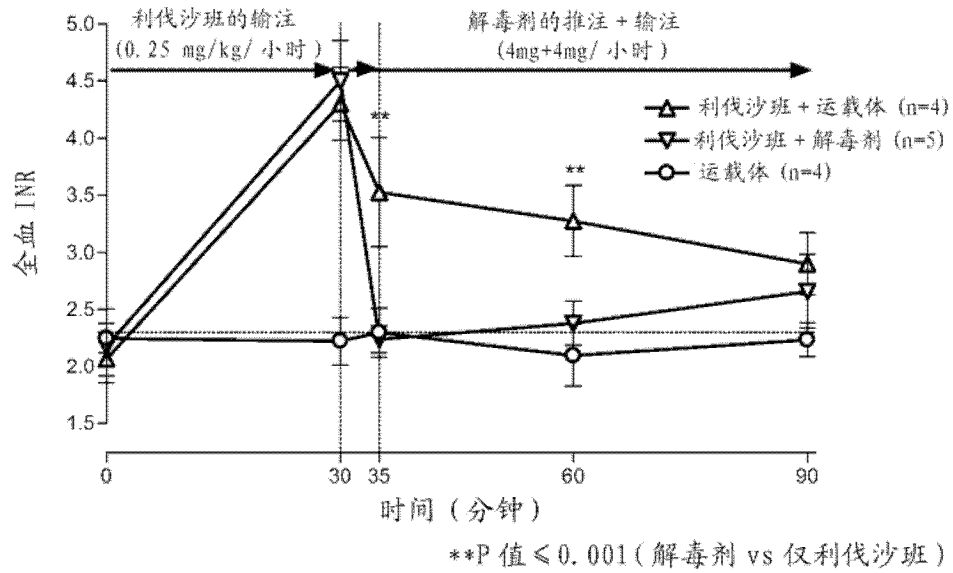


图29A

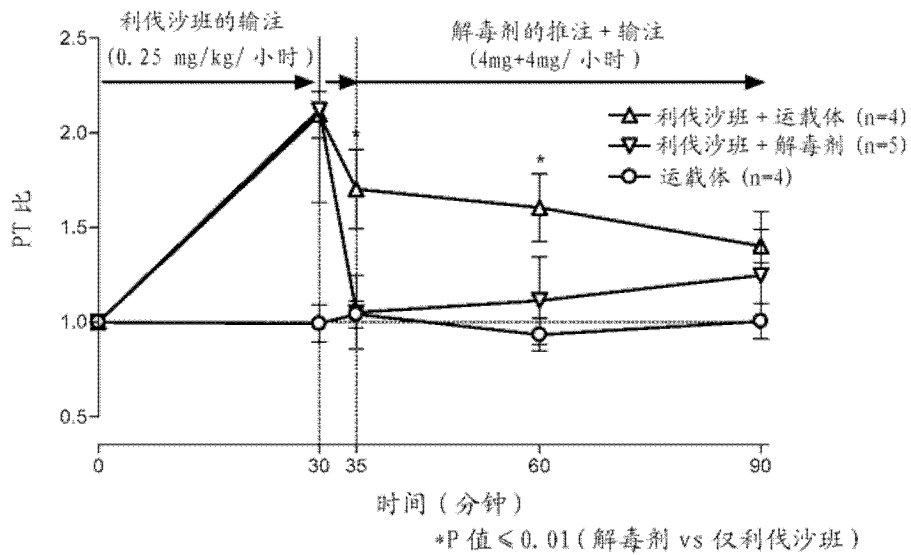


图29B

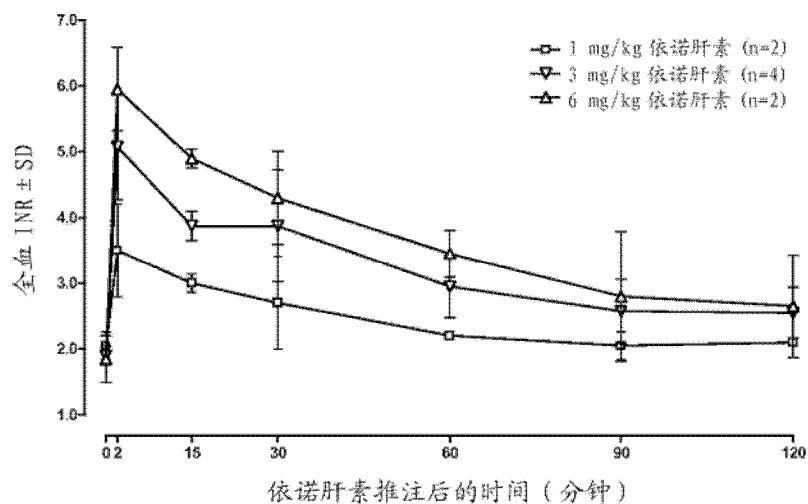


图30

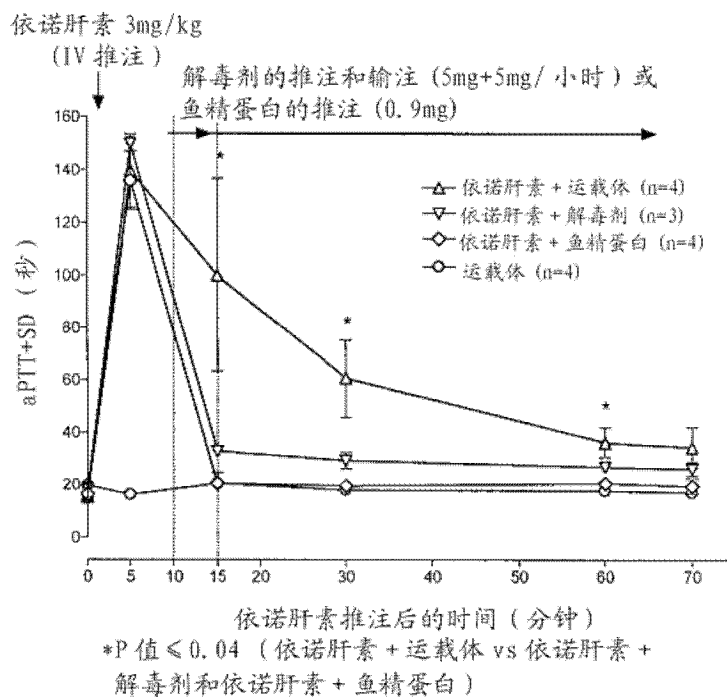


图31

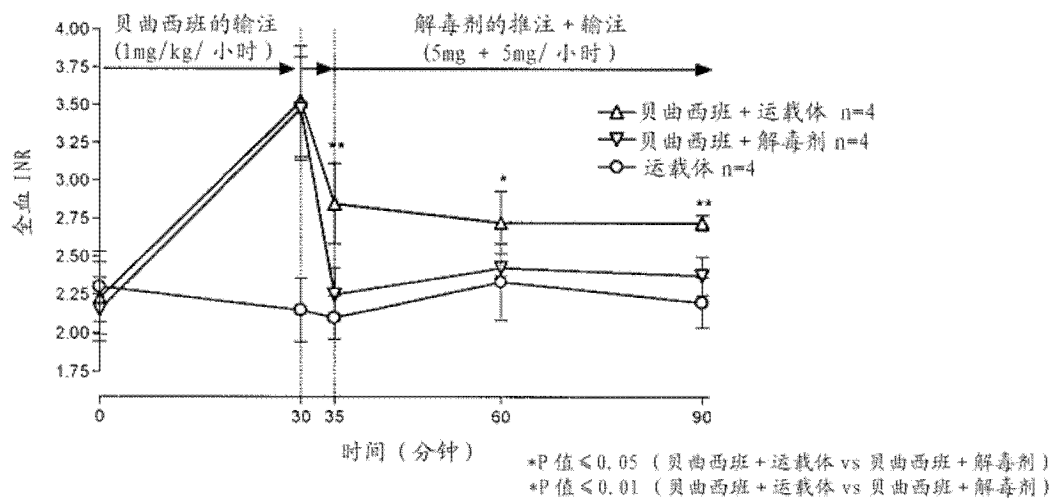


图32

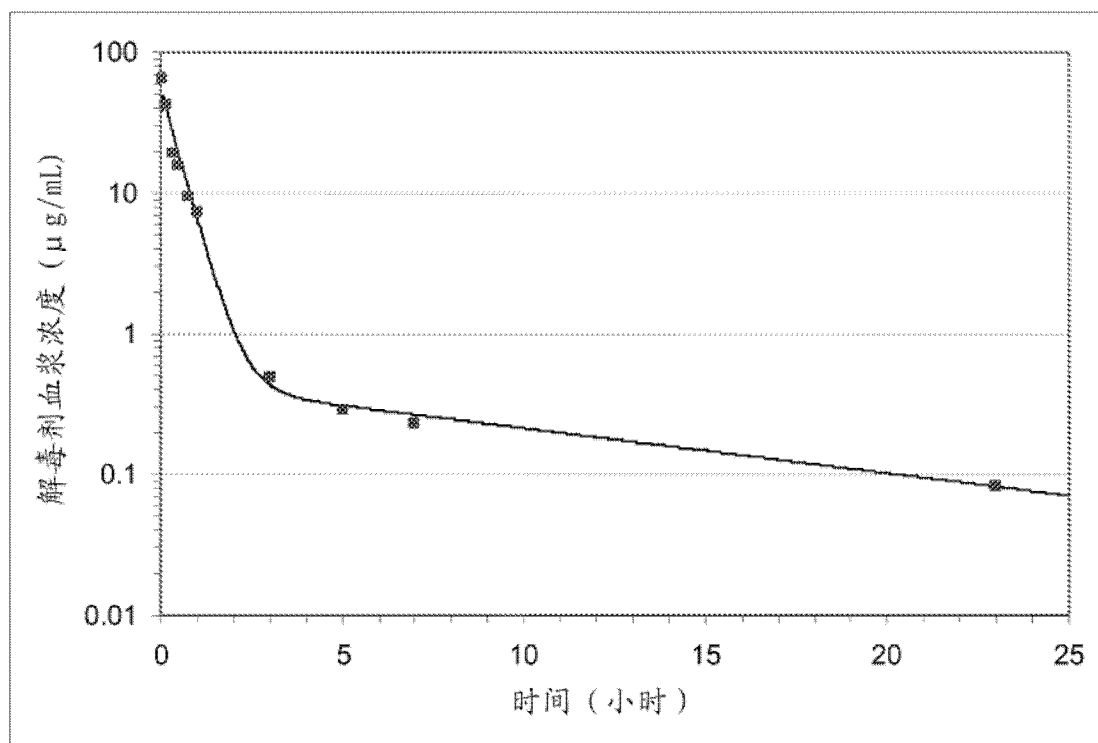


图33

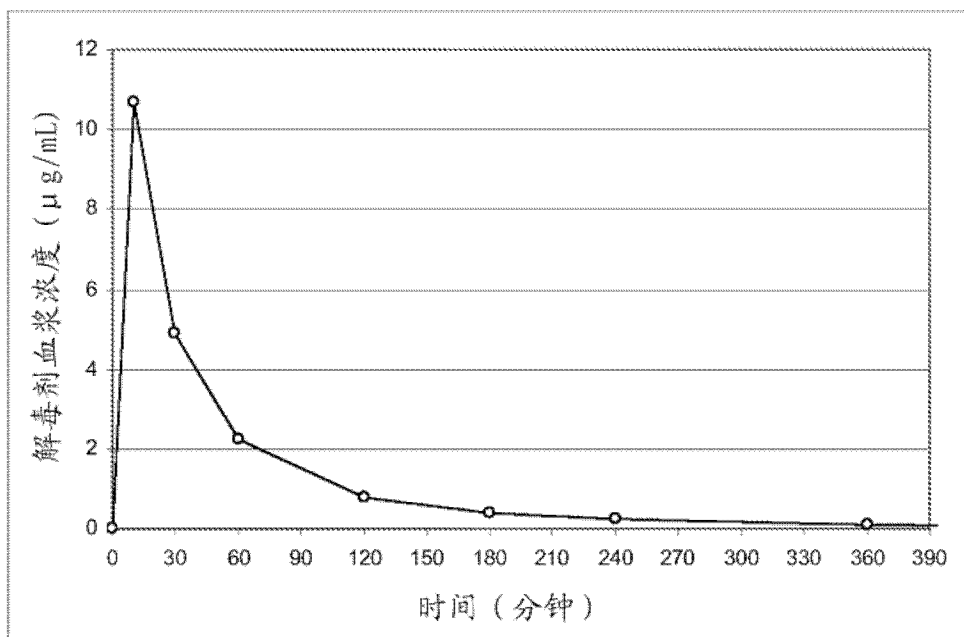


图34

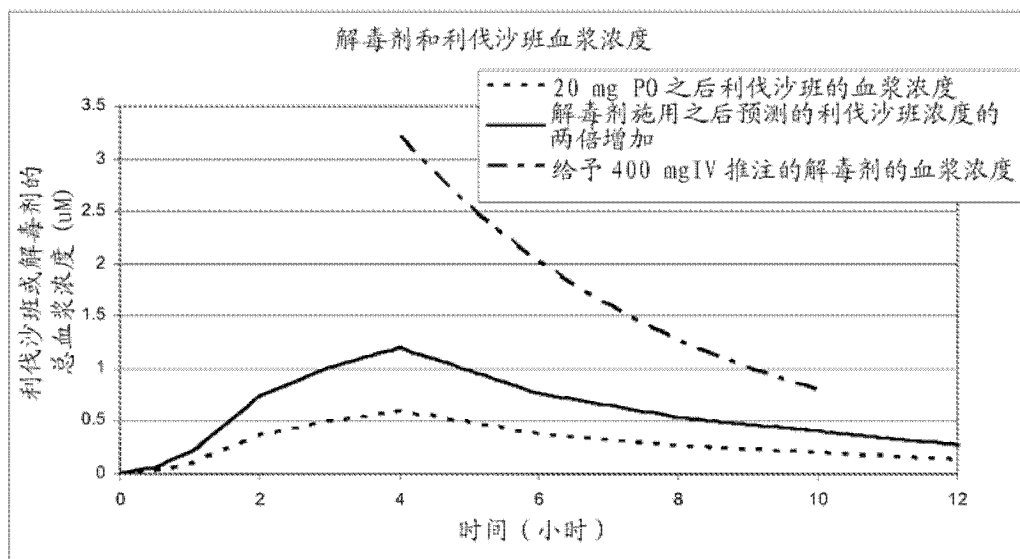


图35A

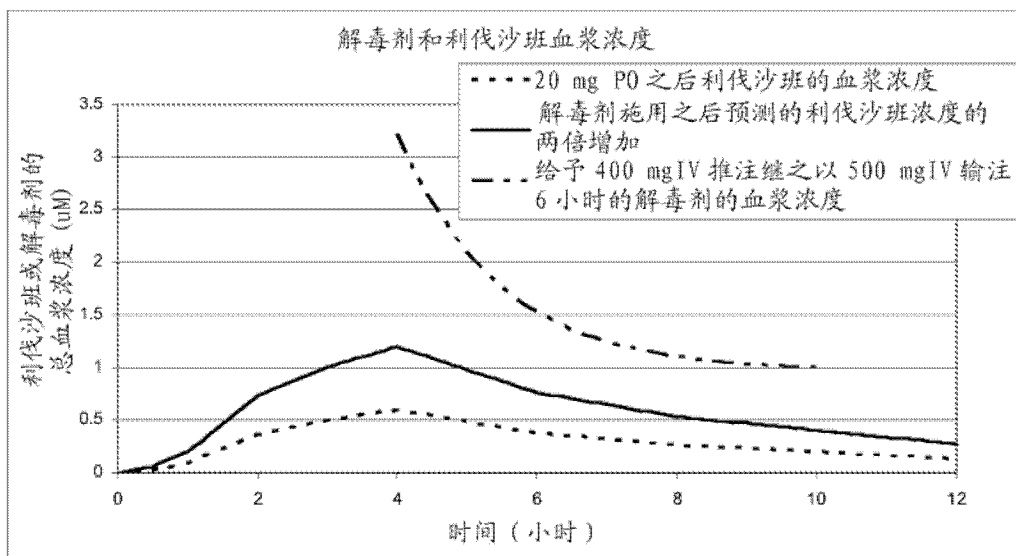


图35B

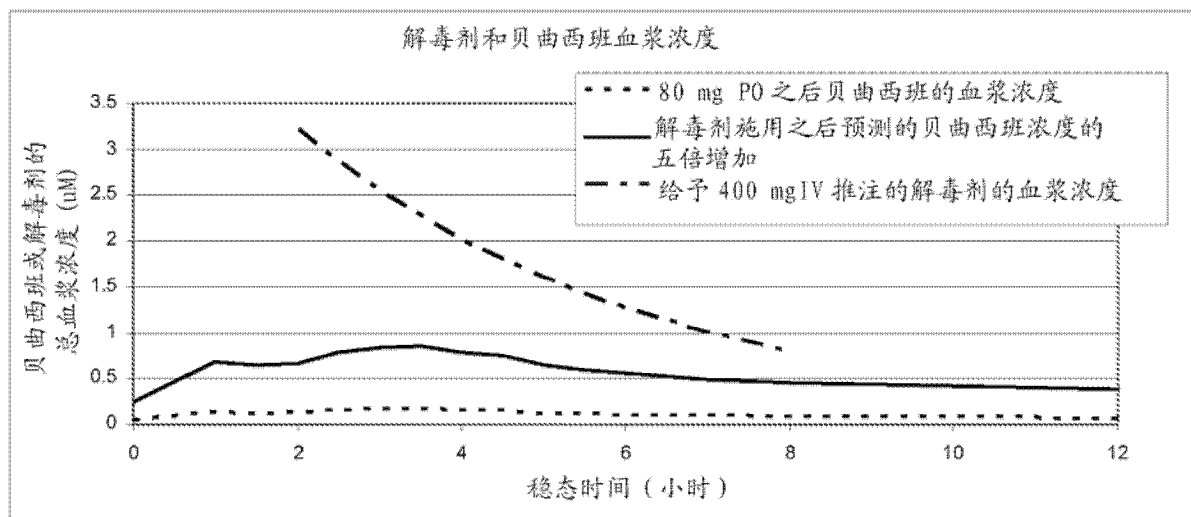


图36A

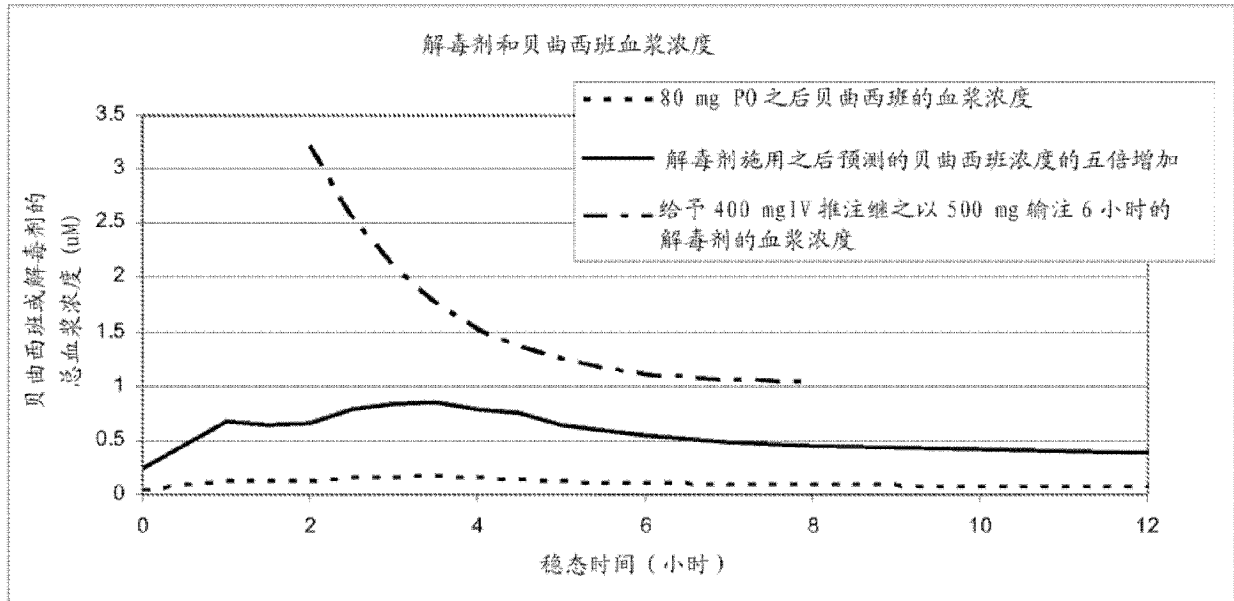


图36B

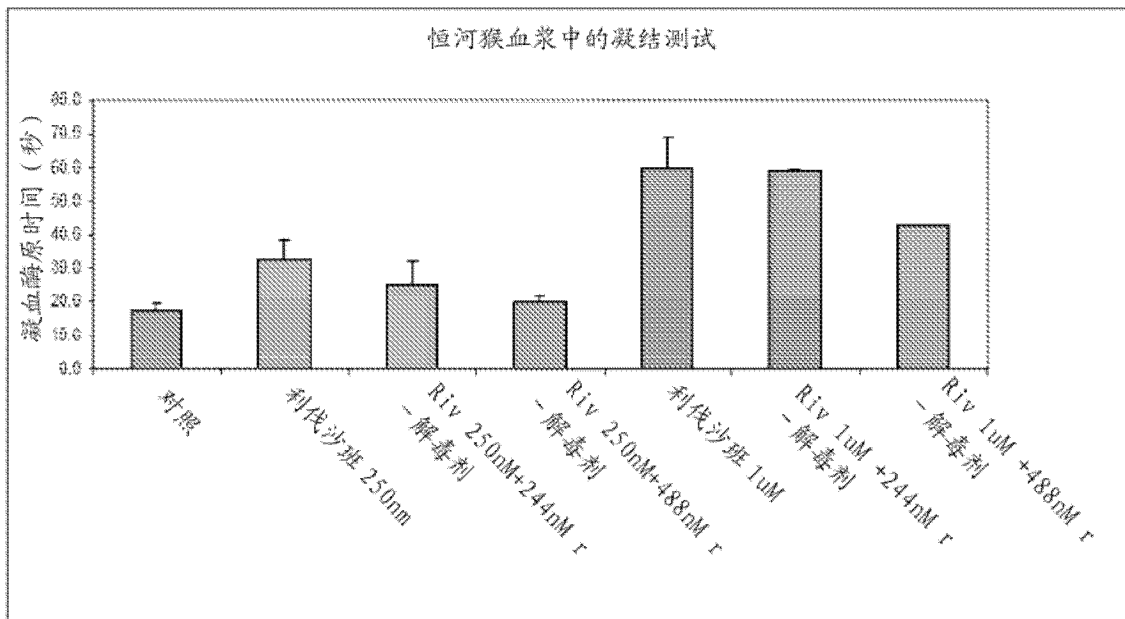


图37

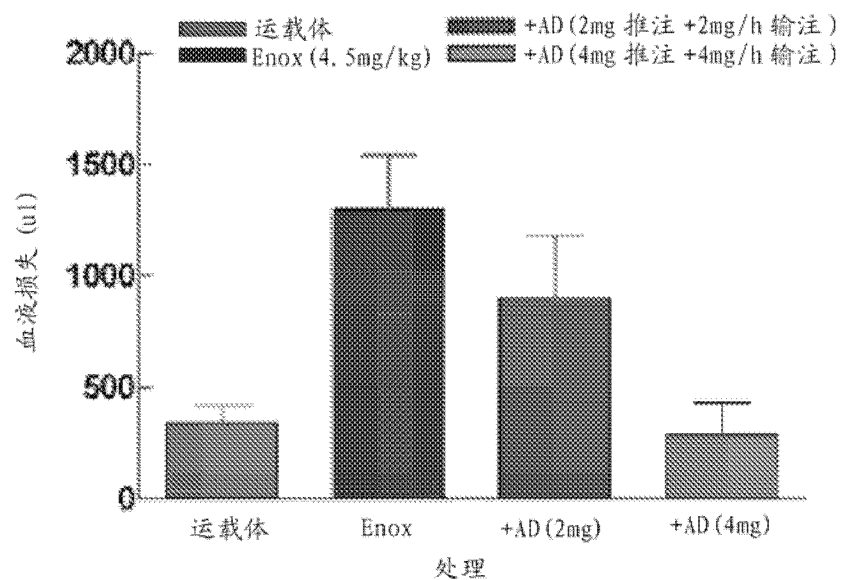


图38

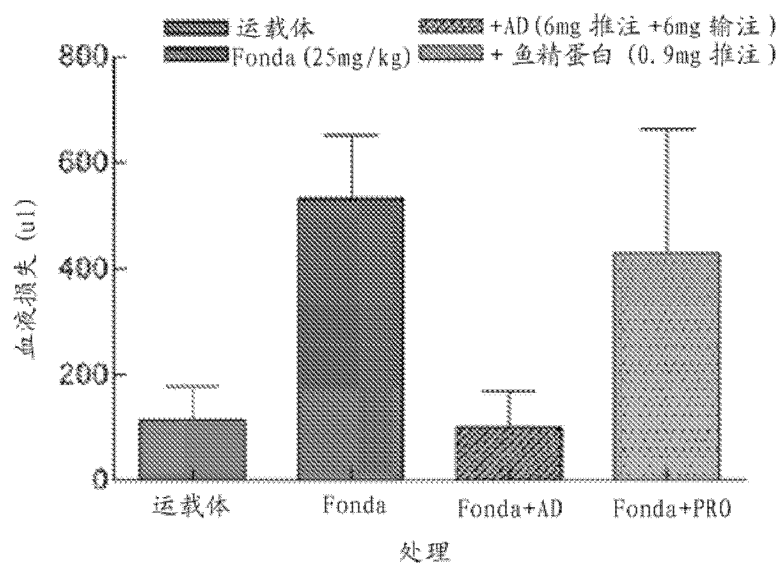


图39

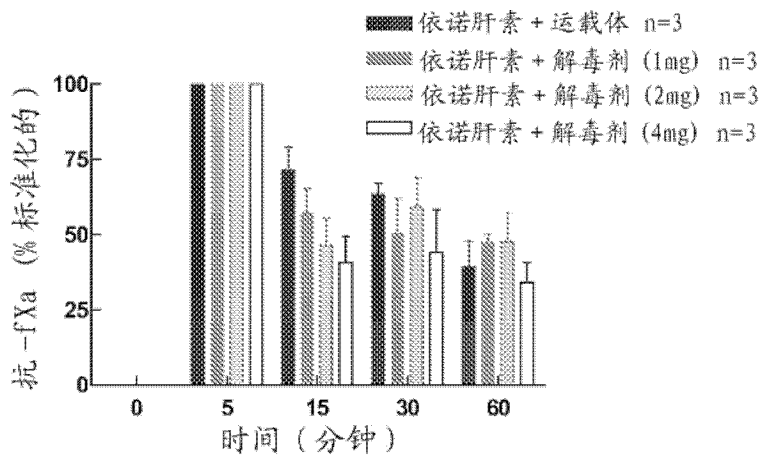


图40

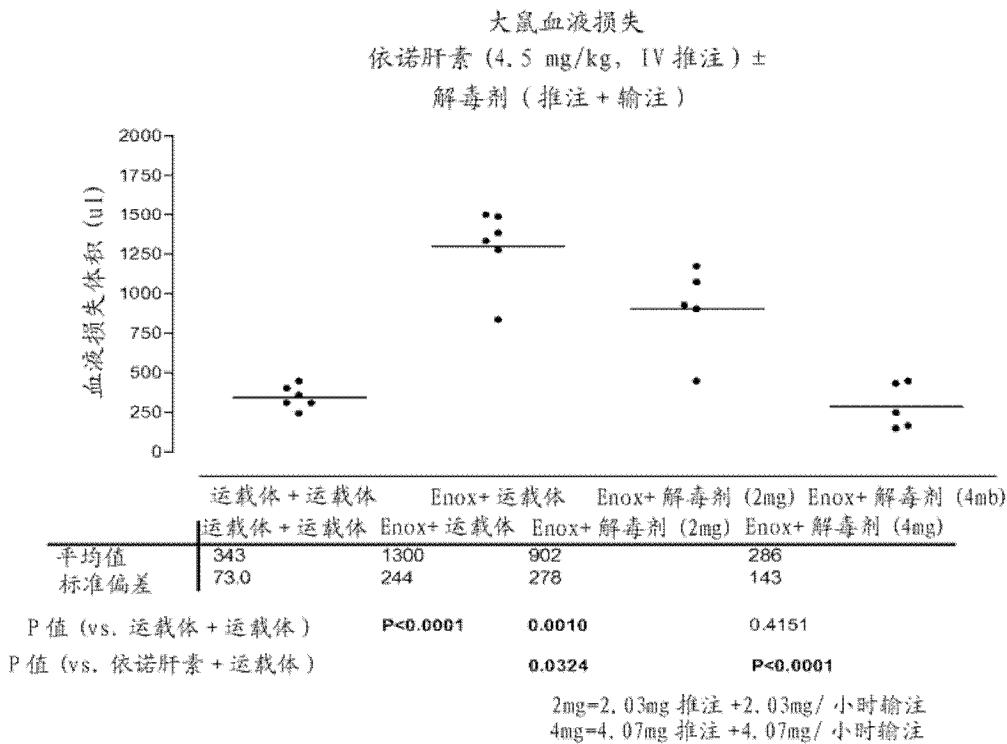


图41

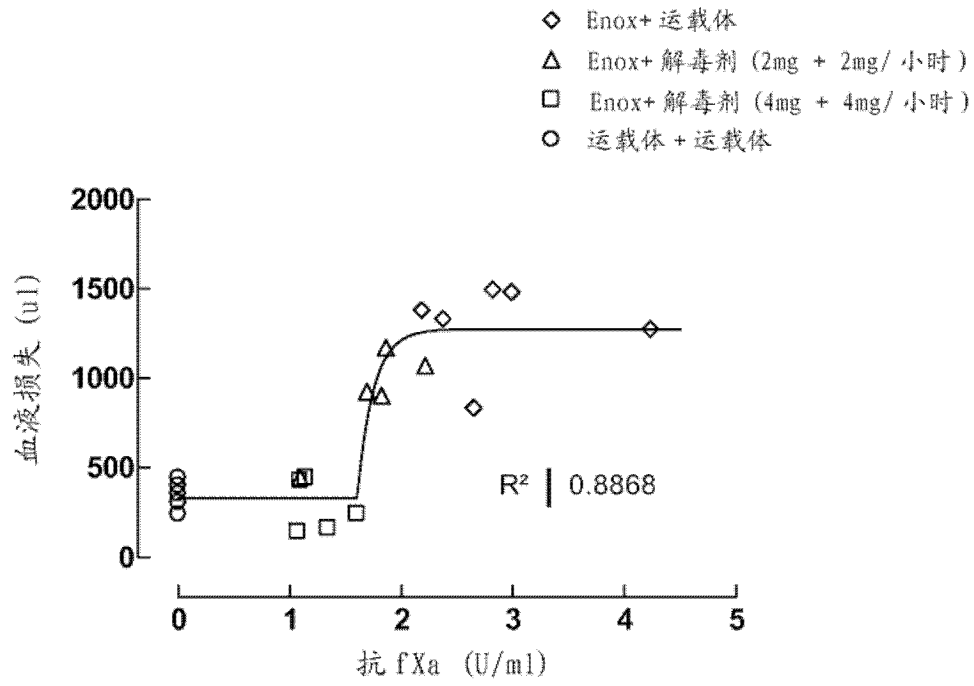


图42a

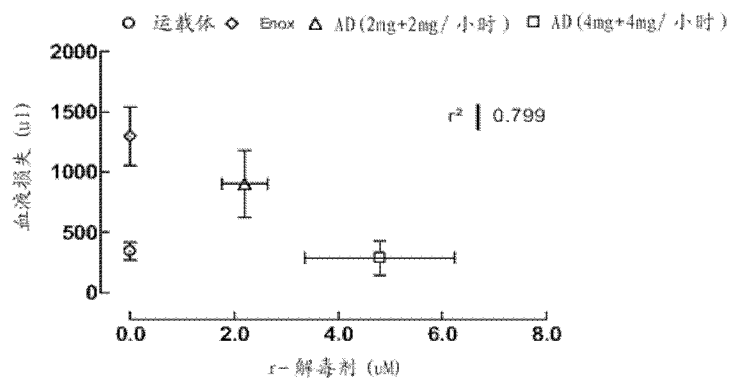


图42b

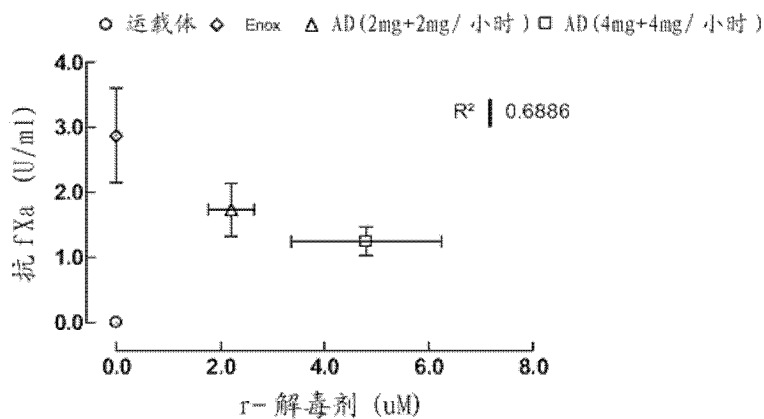


图42c

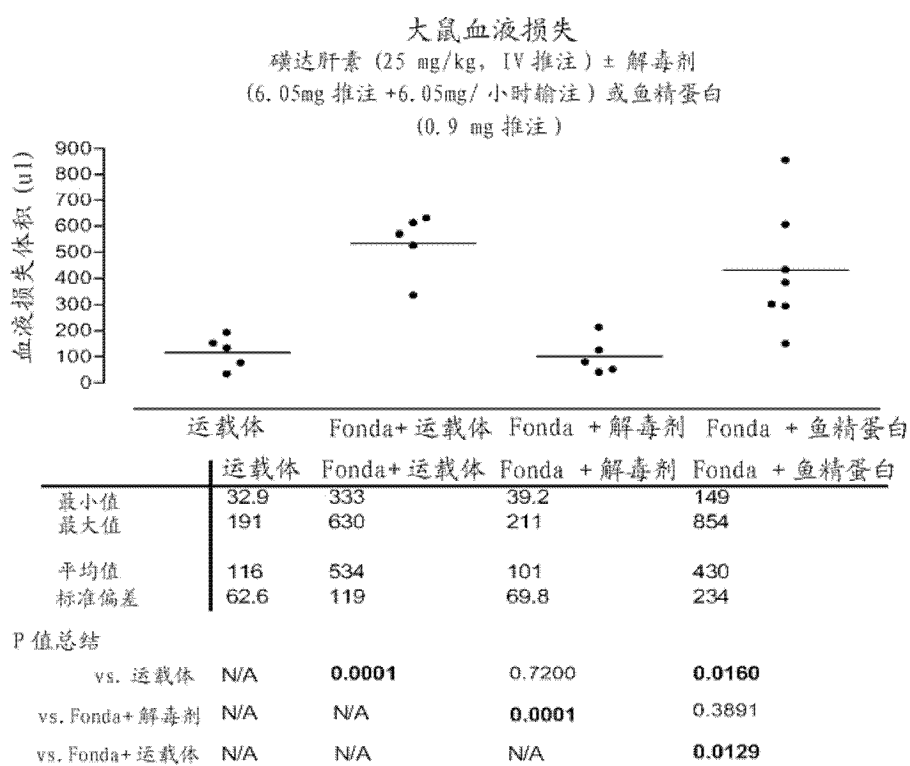
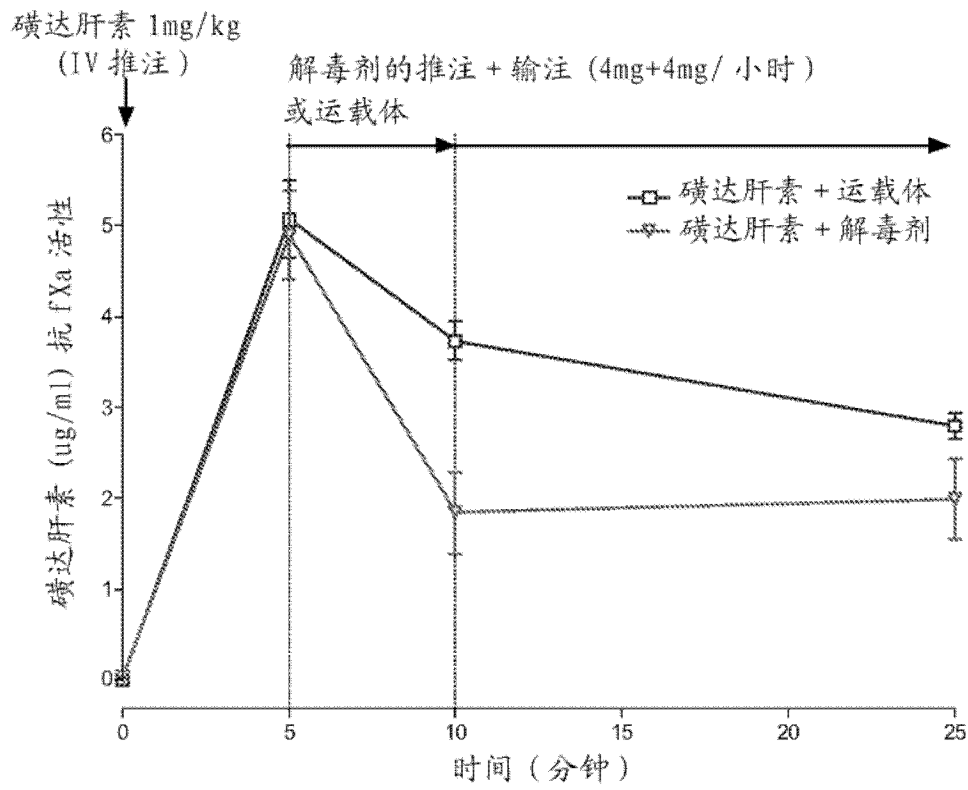


图43



磺达肝素浓度由标准曲线决定，
其中 1 U/mL 磺达肝素 = 0.66 抗 fXa IU/mL 依诺肝素

图44