



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104080470 B

(45)授权公告日 2017.04.19

(21)申请号 201380007416.X

M·诺尔蒂

(22)申请日 2013.01.31

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(65)同一申请的已公布的文献号

利商标事务所 11038

申请公布号 CN 104080470 A

代理人 韩威威

(43)申请公布日 2014.10.01

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61K 38/06(2006.01)

12153341.8 2012.01.31 EP

A61K 38/48(2006.01)

61/592,652 2012.01.31 US

A61K 38/55(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/57(2006.01)

2014.07.31

A61K 39/395(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 47/64(2017.01)

PCT/EP2013/051832 2013.01.31

A61P 25/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61P 37/00(2006.01)

W02013/113774 EN 2013.08.08

C07K 14/00(2006.01)

(73)专利权人 德国杰特贝林生物制品有限公司

(56)对比文件

地址 德国马尔堡

WO 2008/098720 A1, 2008.08.21, 说明书第8页第2段至第11页第5段; 权利要求1-13.

专利权人 CSL有限公司

WO 2006/066878 A1, 2006.06.29, 权利要求1-6.

朱利叶斯-马克西米利维尔茨堡大学

CN 103687878 A, 2014.03.26, 说明书第17-25段及其说明书核苷酸和氨基酸序列表.

威斯特法伦威廉明斯特大学

审查员 曹丙洲

(72)发明人 S·莫伊特 K·格比尔

权利要求书1页 说明书19页

C·克莱茵施尼茨 B·迈肯齐

序列表9页 附图5页

(54)发明名称

用于治疗神经炎症性疾病的因子XII抑制剂

(57)摘要

本申请涉及神经炎症性疾病例如多发性硬化以及施用因子XII抑制剂以预防、治疗或另外地改善神经炎症性疾病例如多发性硬化的方法。还提供了抑制FXII的活性试剂和包含所述试剂的药物组合物。

1. 因子XII抑制剂在制备用于预防和/或治疗和/或改善神经炎症性疾病的药物中的用途,其中所述神经炎症性疾病是多发性硬化、横贯性脊髓炎或视神经脊髓炎,并且其中所述FXII抑制剂包含:

(i) SEQ ID NO:2所示的野生型infestin-4多肽序列;

(ii) 分别示于SEQ ID NOS:3、4、5或6的SPINK-1或SPINK-1突变体K1、K2或K3;

(iii) 抗-FXII抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体结合FXII并抑制其活性和/或激活。

2. 根据权利要求1的用途,其中(iii)中的所述抗-FXII抗体或其抗原结合片段包含:

(a) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO:11中所示的重链CDR2和SEQ ID NO:13中所示的重链CDR3;和

(b) VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:14中所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:15中所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:17中所示的轻链CDR3。

3. 根据权利要求1的用途,其中(iii)中的所述抗-FXII抗体或其抗原结合片段包含:

(a) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO:10中所示的重链CDR2和SEQ ID NO:12中所示的重链CDR3;和

(b) VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:14中所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:15中所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:16中所示的轻链CDR3。

4. 根据权利要求1的用途,其中(iii)中的所述抗-FXII抗体或其抗原结合片段包含VH区和VL区,所述VH区由SEQ ID NO:7组成,所述VL区由SEQ ID NO:8组成。

5. 根据权利要求1的用途,其中所述抗-FXII抗体是IgG。

6. 根据权利要求1至5的任一项的用途,其中将FXII抑制剂连接于半衰期增强多肽,所述多肽为白蛋白、维生素E结合蛋白、 α -甲胎蛋白、维生素D结合蛋白、人白蛋白或其变体、免疫球蛋白或其变体、PEG或其变体、或IgG的Fc。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述半衰期增强多肽通过接头连接于FXII抑制剂。

8. 根据权利要求7的用途,其中所述接头是

(a) 可切割的;

(b) 可被内源性、外源性或共同凝血途径的凝血蛋白酶切割;和/或

(c) 可被因子XIIa切割。

9. 根据权利要求6的用途,其中所述FXII抑制剂是人白蛋白-接头-FXII融合蛋白。

10. 根据权利要求1至5的任一项的用途,其中所述多发性硬化是复发缓解型多发性硬化或原发性进行型多发性硬化。

11. 根据权利要求1的用途,其中(iii)中的所述抗-FXII抗体或其抗原结合片段包含:

(a) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO:11中所示的重链CDR2和SEQ ID NO:12中所示的重链CDR3;和

(b) VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:14中所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:15中所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:16中所示的轻链CDR3。

用于治疗神经炎症性疾病的因子XII抑制剂

[0001] 本申请涉及神经炎症性疾病例如多发性硬化,以及施用因子XII抑制剂以预防、治疗或另外地改善神经炎症性疾病例如多发性硬化的效应的方法。还提供了抑制FXII活性的试剂和包含所述试剂的药物组合物。

[0002] 多发性硬化(MS)是一系列神经炎症性疾病的部分,所述神经炎症性疾病包括免疫细胞的浸润、脱髓鞘作用和轴突/神经元损伤作为它们的病理学的部分。世界卫生组织(ICD-9-CM诊断代码340)将MS描述为慢性疾病,其特征在中枢神经系统中存在许多脱髓鞘区域,具有症状例如虚弱、动作失调、感觉错乱(paresthesis)和言语错乱。MS和其它与其相似的疾病由其中炎症细胞侵入神经系统,从而导致脱髓鞘和组织破坏的自身免疫攻击引起。(Morales等人,Adv Neurol 2006;98:27-45;Frohmman等人,N Engl J Med 2006;354:942-55)。组织病理学结论是具有细胞浸润(T细胞、B细胞、巨噬细胞)的MS斑,其最终据信引起少突神经胶质细胞和轴突损伤。随着破坏性过程进展,脱髓鞘导致认知功能受损。(Ragonese等人,Eur J Neurol 2008;15:123-7;Bergamaschi等人,Neuroepidemiology 2005;25:15-18)。

[0003] 脱髓鞘是形成围绕神经轴突的绝缘层的髓鞘的丢失。取决于解剖学位置,髓磷脂由不同的细胞类型产生。少突神经胶质细胞形成中枢神经系统(CNS)的轴突的髓鞘,而施旺细胞形成周围轴突的髓鞘。髓磷脂由数种蛋白质和脂质组成,包括髓磷脂碱蛋白(MBP)、髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白(MOG)、蛋白脂质蛋白(PLP)、半乳糖脑苷脂(GalC)和鞘磷脂。

[0004] 脱髓鞘疾病的体征和症状取决于脱髓鞘的位置而变化。一些常见体征和症状包括视觉问题(复视、眼球震颤或视力丧失)、麻刺感或麻痹(感觉异常)、说话障碍、记忆丧失、热敏感性、肌肉痉挛、肌无力和协调或平衡的丧失。

[0005] 名称“多发性硬化”是指在脑中和脊髓中在其中髓磷脂丧失的区域中形成的多个疤痕(“硬化”)或损伤。MS的疾病模式可变化。根据美国全国多发性硬化症学会,存在4个标准化亚型:(1)复发缓解型(relapsing remitting),(2)继发进行型(secondary progressive),(3)原发性进行型(primary progressive)和(4)进展复发型(progressive relapsing)。复发缓解型是最常见的最初病程,特征在于间隔以可持续数月至数年的缓解期的发作,在所述缓解期不存在疾病的新体征。继发进行型疾病,如名称所暗示的,开始作为复发缓解型MS,但明确的缓解期最终消失。原发性进行性亚型描述了其中在初始发作后从未存在有意义的缓解的疾病。在进展复发型疾病中,从发作开始存在稳定的神经衰落,但此外还存在迭合发作。

[0006] 多发性硬化可使用McDonald标准2010修正版来诊断,所述诊断依赖于结合临床表现的磁共振成像(MRI)。(Polman等人,Ann Neurol 2011;69:292-302.)。通常地,呈现2或更多次发作或具有两个或更多个客观临床病变的患者被认为患有MS而无需另外的临床证据。在具有更少的发作或更少的可证据的病变的患者中,诊断基于临床或临床和诊断(MRI)发现显示的病变在空间和/或时间上的扩散的客观证据。

[0007] MS的病因学还不清楚,但通常接受其为其中身体的免疫系统破坏CNS中的髓磷脂的自身免疫疾病。(International Multiple Sclerosis Genetics Consortium;Wellcome

Trust Case Control Consortium 2, Nature 2011;476:214-9.)。免疫细胞浸润入CNS的先决条件是通常保护CNS免受浸润的血脑屏障的破坏。该过程导致CNS炎症,其为MS的第二病理学标志。与许多自身免疫疾病一样,MS在妇女中比在男性中更常见,影响大致每100,000人中的3个人。(Alonso,2008.)。除了MS以外,还存在其它脱髓鞘炎症性疾病。例如,其中神经系统的其它脱髓鞘炎症性疾病包括特发性炎症性脱髓鞘疾病、横贯性脊髓炎和视神经脊髓炎(Devic's病)。炎症性脱髓鞘还可在周围神经系统中发生:实例包括格-巴二氏综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、米勒·费希尔综合征和抗-MAG周围神经病。

[0008] 用于MS的目前治疗基于疾病的自身免疫性质并且至少部分地基于使用实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)动物模型的实验来进行开发。(Stüve等人,Arch Neurol.2010;67:1307-15.)。由FDA于2010批准用于治疗MS的复发型的芬戈莫德是通过隔离淋巴细胞、据认为参与介导髓磷脂的破坏的免疫细胞起作用的磷脂。(GILENYA(芬戈莫德),处方信息,07/2011版)。芬戈莫德于2010年在欧洲也接受用于治疗慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病的孤儿药候选药物认证(orphan drug designation)(EU/3/09/718)。用于MS的老年人治疗包括干扰素 β -1a和干扰素 β -1b以及格拉默醋酸盐,其为免疫调节剂。(Herrmann等人,Am.J.Pathol.2010;177:3051-60;Stüve等人,Arch Neurol.2010;67:1307-15.)。那他珠单抗(抗整联蛋白 α 4的人源化单克隆抗体)于2004年被批准用于治疗具有MS的复发型的患者。(TYSABRI(那他珠单抗)处方信息,08/2011版)。其通常用作二线治疗,因为其使用与增加的发生威胁生命的病毒感染的风险相关(PML,进行性多病灶脑白质病)。那他珠单抗阻断白细胞对某些参与细胞从血液至组织内的通过的细胞粘附分子的结合。因此,那他珠单抗被认为通过阻止免疫细胞至CNS内的通过,从而阻止髓磷脂的进一步破坏起作用。米托蒽醌是阻断DNA合成的试剂,因此可减弱淋巴细胞增殖的能力。

[0009] 虽然目前批准的疗法的每一种疗法在至少减少MS的复发型的发作的次数上显示一定的效果,但它们的效果有限,并且在许多情况下与显著的副作用相关,从而使得长期治疗不现实。因此,存在对另外疗法的远未满足的生物医学需要。

[0010] 因子XII(FXII)是参与内源性凝血级联的活化的丝氨酸蛋白酶。其在1955年被鉴定为通过与多聚阴离子接触而被激活(接触激活)的凝血因子。在体内这些表面包括由活化血小板分泌的无机多磷酸(PolyP)(Müller等人,2010)、内皮细胞表面(qC1qR)、细胞角蛋白1、尿激酶-纤溶酶原激活物(u-PAR,CD87)、关节软骨、皮肤、脂肪酸、内毒素、蛋白聚糖(硫酸肝素、硫酸软骨素E、肥大细胞肝素)和淀粉样蛋白。(Schmaier,2008.)。在FXII已被激活以形成FXIIa后,存在其中FXIIa激活循环FXII的正反馈反应。多种FXII抑制(从小分子变化至蛋白质)是可获得的。虽然FXII是内源性途径中起始因子,但因子XII缺乏不促成出血,因为外源性(组织因子)途径是血块形成的主要途径。

[0011] 尽管其在内源性途径中作用得以公认,但因子XII的生理作用仍然不清楚。(Schmaier,J.Clin.Invest.2008;118:3006-9;Stavrou &Schmaier,Thromb.Res.2010.)。FXII通过缓激肽的形成(通过激肽-激肽释放酶系统)参与炎症过程。缓激肽造成发红、热、肿胀和疼痛的典型炎症参数,这通过内皮细胞的活化(以增加血管通透性)、一氧化氮的产生)和花生四烯酸的动员,以及通过刺激感觉神经末梢引起。其还参与缺血的病理性血栓形成。(Kleinschnitz等人,J.Exp.Med.2006;203:513-8.)。FXII的另一个作用在于中性粒细胞的趋化作用、聚集和脱粒。(Wachtfogel等人,1986.)。其还可增强促炎细胞因子IL-1的单

核细胞产生,以及参与补体系统。

[0012] 某些实施方案的概述

[0013] 因此,FXII参与多个复杂途径,但仍然不清楚FXII在体内对于这些途径中的任何途径是否是必需的。例如,缺乏FXII的人即使在大手术过程中也不遭受异常出血素质。(Schmaier, J.Clin.Invest.2008;118:3006-9.)。此外,虽然FXII可参与纤维蛋白沉积,已报道其在MS中被激活(Marik等人Brain 2007;130:2800-15),和参与也可促成MS的缓激肽的激活(Göbel等人J.Autoimmunity 2011;36:106-14),但不清楚其是引起这些效应的FXII依赖性途径还是共有相同的最终结果(例如通过外源性凝血途径产生的血纤蛋白沉积)的另一个途径。因此,目前缺乏FXII在MS的任何病理特性中的作用的直接证据。

[0014] 虽然因子XII (FXII) 在炎症性脱髓鞘中的作用目前未被承认,但本申请的实施方案提供FXII的抑制剂以预防、治疗或改善多发性硬化和炎症性脱髓鞘的其它形式。本申请提供了施用因子XII抑制剂以预防、治疗或另外地改善神经炎症性疾病包括多发性硬化的效应的方法。“FXII抑制剂”是指因子XII和活化因子XII (FXIIa) 的任一种或两种的抑制剂。

[0015] 因此,在一个方面,本发明提供了预防、治疗或改善神经炎症性疾病的方法,包括给有些需要的受试者施用治疗有效量的因子XII (FXII) 抑制剂,从而预防、治疗或改善神经炎症性疾病。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了因子XII的抑制剂以用于预防、治疗或改善神经炎症性疾病,包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的因子XII (FXII) 抑制剂。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了因子XII抑制剂用于预防、治疗或改善神经炎症性疾病的用途,包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的因子XII (FXII) 抑制剂。

[0018] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,FXII抑制剂可包括野生型infestin-4多肽序列(SEQ ID NO:2)或其变体,其中所述变体包含:(a) SEQ ID NO:2的N末端氨基酸2-13;和N末端氨基酸外部的至少1个和多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生型infestin-4序列的差异;和/或(b) 6个保守半胱氨酸残基;和与野生型infestin-4序列至少70%的同源性。

[0019] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,FXII抑制剂可包括SPINK-1 (SEQ ID NO:3),其被突变来包括SEQ ID NO:2的N末端氨基酸2-13,或突变的SPINK-1的变体,其中变体包含(a) SEQ ID NO:2的N末端氨基酸2-13;和N末端氨基酸外部的至少1个和多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生SPINK-1序列的差异和增加变体与野生型infestin-4序列的同源性;和/或(b) 6个保守半胱氨酸残基;和与野生型SPINK-1序列至少70%的同源性。

[0020] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,FXII抑制剂可包括SPINK-1或SPINK-1突变体K1、K2或K3(分别地SEQ ID NOS:3、4、5或6)。

[0021] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,FXII抑制剂可包括H-D-Pro-Phe-Arg-氯甲基酮(PCK)、AT III、血管紧张素转化酶抑制剂、C1抑制剂、抑肽酶、 α -1蛋白酶抑制剂、抗蛋白酶素([S]-1-羧基-2-苄乙基)-氨甲酰基-L-Arg-L-Val-Arginal)、Z-Pro-Pro-乙醛-二甲基醋酸酯、DX88、亮抑酶肽、脯氨酰寡肽酶的抑制剂例如Fmoc-Ala-Pyr-CN、玉米-胰蛋白酶抑制剂、牛胰蛋白酶抑制剂的突变体、ecotin、YAP(yellowfin sole anticoagulant protein,黄盖鲈抗凝蛋白)、笋瓜(Cucurbita maxima)胰蛋白酶抑制剂-V或笋瓜同效抑制剂。

[0022] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,FXII抑制剂可包含抗-FXII抗体或其抗原结合片段,其中抗体结合FXII并抑制其活性和/或激活。

[0023] 在其中FXII抑制剂是抗体或其抗原结合片段的那些实施方案中,抗-FXII抗体或其抗原结合片段可包含(a)包含SEQ ID NO:9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO:11中所示的重链CDR2和SEQ ID NO:13中所示的重链CDR3的VH区;和/或(b)包含SEQ ID NO:14中所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:15中所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:17中所示的轻链CDR3的VL区。在这些实施方案中的一些实施方案中,抗-FXII抗体或其抗体或其抗原结合片段包含(a)包含SEQ ID NO:9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO:10中所示的重链CDR2和SEQ ID NO:12中所示的重链CDR3的VH区;和/或(b)包含SEQ ID NO:14中所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:15中所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:16中所示的轻链CDR3的VL区。在某些实施方案中,抗-FXII抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7的VH区和包含SEQ ID NO:8的VL区。在牵涉抗体的任何实施方案中,抗-FXII抗体可以是IgG。在任何实施方案中,当以1:0.2的FXIIa- α 对抗体的摩尔比使用时,抗-因子XII/XIIa单克隆抗体或其抗原结合片段可抑制人因子XIIa- α 超过50%。

[0024] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,可将FXII抑制剂连接于半衰期增强多肽,所述多肽为白蛋白、维生素E结合蛋白(afamin)、 α -甲胎蛋白、维生素D结合蛋白、人白蛋白或其变体、免疫球蛋白或其变体、PEG或其变体或IgG的Fc。在这些实施方案的一些实施方案中,半衰期增强肽通过接头连接于FXII抑制剂。在牵涉接头的实施方案的一些实施方案中,接头可以是(a)可切割的;(b)可被内源性、外源性或共同凝血途径的凝血蛋白酶切割;和/或(c)可被因子XIIa切割。

[0025] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,FXII抑制剂可包括人白蛋白-接头-FXII融合蛋白。

[0026] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,神经炎症性疾病可以是多发性硬化(MS)。在那些牵涉MS的实施方案的一些实施方案中,MS可以是复发缓解型多发性硬化。在其它牵涉MS的其他方案中,MS可以是原发性进行型多发性硬化。

[0027] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,神经炎症性疾病可以是横贯性脊髓炎。

[0028] 在本发明的任何方面的各种实施方案中,神经炎症性疾病可以是视神经脊髓炎(Devic's病)。

[0029] 本申请中的实施方案的其它目的和有利方面部分地出现于下列说明中并且根据说明书将部分地很明了,或它们可在实践中习得。实施方案的目的和有利方面本身将通过在所附权利要求中特别指出的元素和组合来表现出来。

[0030] 附图概述

[0031] 图1显示infestin的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0032] 图2比较infestin-4(SEQ ID NO:2)、SPINK-1(SEQ ID NO:3)和3个SPINK-1变体(K1(SEQ ID NO:4)、K2(SEQ ID NO:5)和K3(SEQ ID NO:6))的氨基酸序列。*表示相同的氨基酸,|表示相对于Infestin-4序列相似的氨基酸。infestin-4的加以下划线的序列用于替代SPINK-1的15个氨基酸以产生K1。变体K2和K3通过K1序列上的另外的点突变(加以下划线的氨基酸)产生。

[0033] 图3显示了人白蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:19)。

[0034] 图4A-D描述了作为时间的函数的小鼠的EAE分数。图4A显示与对照小鼠 (Con) 相比较的FXII^{-/-}小鼠。图4B显示与对照小鼠 (Con) 相比较的FXI^{-/-}小鼠。图4C和4D显示相较于始于免疫当天 (图4C) 或始于第12天 (图4D) 的对照利用FXII抑制剂PCK处理的小鼠的分数。

[0035] 图5A-5E概述了组织学和体外功能数据。图5A描述了炎性病灶的数目,图5B脱髓鞘区域/切片,和图5C对照小鼠 (左条块)、PCK处理小鼠 (中间条块) 和FXII^{-/-}小鼠 (右边条块) 的轴突计数。对于每一个条线图显示了对照 (Con) 与PCK处理小鼠之间的组织学比较的实例。图5D显示脾细胞响应CD3/CD28或MOG刺激的增殖。图5E概述了来自对照小鼠 (左条块)、PCK处理小鼠 (中间条块) 和FXII^{-/-}小鼠 (右条块) 的脾细胞的细胞因子分泌。

[0036] 图6A显示利用FXII抑制剂、rHA-Infestin-4处理的小鼠的作为时间的函数的EAE分数。图6B比较对照 (左条块) 小鼠与rHA-Infestin-4-处理 (右图) 小鼠的细胞因子IL-17的水平。

[0037] 图7显示利用抗-因子XII抗体 (实心菱形) 或利用同种型对照抗体 (空心方块) 处理的小鼠的作为时间的函数的瘫痪分数。

[0038] 图8显示抗-FXII处理小鼠和对照小鼠的血液中的细胞因子GM-CSF、IFN γ 、TNF α 和IL-1 β 的细胞因子水平。

[0039] 详述

[0040] 本申请的实施方案涉及包括给患者施用至少一种因子XII (FXII) 抑制剂来预防、治疗或另外地改善神经炎症性疾病的影响的方法。

[0041] 本申请的实施方案的一个有利方面是FXII抑制剂相较于其它药物具有改善的安全特征,因为它们预期被良好地耐受。此外,由于FXII参与若干生理学级联,因此,其的一种或多种可牵涉炎症性脱髓鞘疾病例如MS,FXII抑制剂相较于单靶疗法可具有更好的功效特征。

[0042] I. 炎症性脱髓鞘疾病

[0043] 一个方面本发明涉及预防、治疗或另外地改善炎症性脱髓鞘疾病的影响的方法,包括给有此需要的受试者施用至少一种因子XII (FXII) 抑制剂,从而预防、治疗或改善神经炎症性疾病的影响。因此,本发明还提供了用于预防、治疗或改善炎症性脱髓鞘疾病的影响的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0044] 如本文中所用,术语“治疗”和“医治”不需要症状的完全消除,这些术语不等同于“治愈”或“愈合”。相反地,“治疗”和“医治”意指疾病的至少一个体征或症状已被减轻、抑制、减弱或延迟。在一些实施方案中,体征或症状是下文中描述的主要或次要终点的一个或多个。在某些实施方案中,“治疗”或“医治”还可包括改善疾病的影响。然而,一般而言,“改善影响”意指反映患者功能的病损的疾病的一些方面得到改善。可使用疾病的确立标准,包括使用多发性硬化 (MS) 的Kurtzke扩展残疾状态评分 (EDSS) (Kurtzke JF, Neuroepidemiol. 2008; 31:1-9) 来进行功能性评估,如下文中描述的。如此处所用,“预防”意指给已知处于发生炎症性脱髓鞘疾病的风险中或处于缓解和随后复发的那些疾病中的受试者施用疗法,“预防”可意指抑制处于缓解中的患者的复发。如下文中针对MS指出的,“预防”还意指满足一些但非全部MS诊断标准但不进展至完全满足诊断标准的明显的疾病的患者。

[0045] 术语“神经炎症性疾病”和“炎症性脱髓鞘疾病”基本上可互换地用于指人患者或

动物的在脑或脊髓的一个或多个区域存在炎症的病况。然而,术语不完全等同,本领域技术人员应理解,神经炎症性疾病不一定需要脱髓鞘,尽管脱髓鞘通常发展下列炎症。多发性硬化是人的炎症性脱髓鞘疾病的一个实例。在多种动物包括小鼠、大鼠和猴中,炎症性脱髓鞘可通过几个不同的免疫策略来实验地诱发,所述免疫策略是公知的并且被接受为人疾病的模型。(Reviewed in Krishnamoorthy & Wekerle, Eur. J. Immunol 2009;39:2031-35.)。两个不同的免疫策略示于实施例。所得的诱发的疾病实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)是炎症性脱髓鞘疾病的另一个实例,虽然是实验性疾病和相应地被限制于非人受试者。

[0046] 在一些实施方案中,炎症性脱髓鞘疾病是中枢神经系统(CNS)的疾病。示例性疾病包括但不限于多发性硬化、特发性炎症性脱髓鞘疾病、横贯性脊髓炎和视神经脊髓炎(Devic's病)。

[0047] 在一些实施方案中,炎症性脱髓鞘疾病是周围神经系统的疾病。示例性疾病包括但不限于格-巴二氏综合征,慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、米勒·费希尔综合征和抗-MAG周围神经病。

[0048] 在某些实施方案中,本发明提供了预防、治疗或改善多发性硬化的影响的方法,包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的至少一种因子XII抑制剂,从而预防或治疗多发性硬化或改善多发性硬化的影响。因此,本发明还提供了用于预防或治疗多发性硬化,或用于改善多发性硬化的影响的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0049] 在那些牵涉多发性硬化的实施方案中,具有MS的受试者可使用“McDonald标准”来诊断,这依赖于与临床表面结合的磁共振成像(MRI)。(Polman等人, Ann Neurol 2011;69:292-302.)。一般而言,呈现两次或更多次发作或具有两个或更多个客观临床病变的患者被认为患有MS而无需另外的临床证据。在具有更少发作或更少可表明的病变的患者中,诊断基于通过临床或临床和诊断(MRI)发现显示的病变在空间和/或时间上的扩散的客观证据。病变在空间上的扩散的临床证据通过中枢神经系统的下列区域的4个中的至少2个中的一个或多个T2病变来证明:脑室旁、近皮质、幕下或脊髓。病变在时间上的扩散通过根据跟进MRI的新的T2和/或钆增强病变或无症状钆增强和非增强病变随时的同时存在来证明。原发性进行型MS在具有一年的疾病进展(包括可追溯的)加上两个或多个如下方面的受试者中得到诊断:A)基于脑中的至少一个MS的特征区域(脑室旁,近皮质或幕下)中的一个或多个T2病变的空间上的扩散的症状,或B)基于超过2个T2病变的脊髓中的空间上的扩散的证据,和C)寡克隆带(oligoclonal band)和/或升高的IgG指数在脑脊髓液中的存在。(Polman等人, Ann Neurol 2011;69:292-302.)。

[0050] 在一些实施方案中,患者具有或已具有至少一个临床发作或至少一个客观临床病变,但从未呈现足够数目的临床发作和客观临床病变来使用McDonald标准确立多发性硬化的诊断。这样的患者是“处于发生多发性硬化的风险”中的患者,并且给“处于发生MS的风险中”的患者施用FXII抑制剂可用于在受试者不进展至可在McDonald标准下作出MS的诊断的点的意义上预防MS。因此,在一个实施方案中,提供了预防多发性硬化的方法,包括给处于发生多发性硬化的风险中的受试者施用至少一种FXII抑制剂,从而预防多发性硬化。同样地,本发明还提供了用于预防处于发生多发性硬化的风险中的受试者的多发性硬化的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0051] 在那些牵涉已被诊断患有多发性硬化的受试者的实施方案中,可基于疾病过程将受试者分类成具有(1)复发缓解型、(2)继发进行型,(3)原发性进行型和(4)进展复发型MS的患者。

[0052] 因此,本发明在某些实施方案中提供了预防、治疗或改善多发性硬化的影响的方法,包括给诊断为患有复发缓解型MS的患者施用治疗有效量的至少一种因子XII抑制剂,从而预防或治疗复发缓解型MS或改善复发缓解型MS的影响。此外,本发明还提供了用于预防、治疗或改善复发缓解型多发性硬化的影响的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0053] 在另外的实施方案中,本发明提供了用于预防、治疗或改善多发性硬化的影响的方法,包括给被诊断为患有继发进行型MS的患者施用治疗有效量的至少一种因子XII抑制剂,从而预防或治疗继发进行型MS或改善继发进行型MS的影响。此外,本发明还提供了用于预防、治疗或改善继发进行型多发性硬化的影响的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0054] 在其它实施方案中,本发明提供了预防、治疗或改善多发性硬化的影响的方法,包括给经诊断患有原发性进行型MS的患者施用治疗有效量的至少一种因子XII抑制剂,从而预防或治疗原发性进行型MS或改善原发性进行型MS的影响。此外,本发明还提供了用于预防、治疗或改善原发性进行型多发性硬化的影响的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0055] 在其它实施方案中,本发明提供了预防、治疗或改善多发性硬化的影响的方法,包括给经诊断患有进展复发型MS的患者施用治疗有效量的至少一种因子XII抑制剂,从而预防或治疗进展复发型MS或改善进展复发型MS的影响。此外,本发明还提供了用于预防、治疗或改善进展复发型多发性硬化的影响的包含因子XII抑制剂和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0056] 改善任何类型的MS的影响或治疗所述MS的一个实例是受试者的残疾状态的减少或至残疾进展的时间的增加。残疾状态可使用Kurtzke扩展残疾状态评分(EDSS)。(Kurtzke JF, Neuroepidemiol 2008;31:1-9.)来评价(或打分)。例如,如果抑制剂减少至“残疾的持续增加”(被定义为持续12周的从基线EDSS ≥ 1.0 开始的EDSS的至少1点的增加,或持续12周的从基线EDSS=0开始的EDSS的至少1.5点的增加)的发作的时间,则其减少残疾评分。改善任何类型的MS的影响或治疗所述MS的其它实例可通过MRI测量:例如,在确定的时期例如12、24、36或48月中新的或新近扩大的T2高强度病变的中位数的减少;或在确定的时期例如12、24、36或48月中T1钆增强病变数目的减少。

[0057] 一般地,可用于显示根据本发明的FXII抑制剂正在治疗MS或改善MS的影响的标准包括下列结果(单独地或以任何亚组合地):对比增强MRI病变的数目的程度的减小;残疾持续累积风险(Sustained Accumulation of Disability)(SAD)等级的降低;复发发生的减少;至复发的时间的增加;在初始治疗后例如1、2、3或更多年无复发的患者的比例的升高;根据脑扫描的脑萎缩速率的减小;MRI T2病变体积的减小;脑脊髓液(“CSF”)骨桥蛋白水平的改变;扩展残疾状态评分(EDSS)的改善;定时25英尺走(T25FW)测试的改善;多发性硬化损害评分(MSIS)的改善;多发性硬化功能复合短表36健康调查(Functional Composite Short Form 36Health Survey)(SF36)的改善;脑脊髓液中神经丝重链的水平改善;脑脊

髓液中髓磷脂碱蛋白水平的改善;标准化脑体积(NBV)、灰质体积(GMV)和/或白质体积(WMV)的改善;全脑、病变、表现正常的灰质(NAGM)或表现正常的白质(NAWM)的磁化传递率(MTR)的改善;病变中的FA和ADC、GM和NAWM中的扩散转移成像(DTI)的改善;CSF细胞计数的改善;IgG-指数的改善;CSF氧化氮代谢物的改善;CSF血清白蛋白浓度商的改善;CSF CXCL13水平的改善;基质金属蛋白酶-9(MMP-9)水平的改善;新的钆增强病变(GdEL)的减少;根据T2加权MRI像的病变体积的减小,根据T2加权MRI像的新的病变或扩大病变的数目的减少;这些标准的任意组合;或这些标准的任意亚组合。对于所述标准中的任何标准,可相对于治疗开始时的时间判断标准。

[0058] 在那些牵涉复发型MS的实施方案中,根据本发明的FXII抑制剂也治疗或改善MS,如果其减小年复发率或增加保持无复发一段确定的时期(例如6个月、12个月、18个月、24个月、36个月、48个月或60个月(或其间的任何时间))的患者的百分数的话。

[0059] EAE模型可用于确定特定FXII抑制剂是否预防、治疗或改善多发性硬化。EAE模型是被接受的MS动物模型,并且已用于开发由FDA批准用于治疗多发性硬化的药物。(E.g., St üve等人, Arch. Neurol. 2010; 67: 1307-15; Yednock等人, Nature 1992.)。因此,如果特定FXII抑制剂在一个或多个EAE模型例如实施例描述的那些模型中显示活性,则本领域技术人员可预期FXII抑制剂也在多发性硬化的影响的预防、治疗或改善中显示活性。然而,值得指出的是, EAE模型中的失活不排除在多发性硬化中的活性。例如,一个早期的MS治疗干扰素 β 在EAE模型中不是非常有效。(Stüve等人, Arch. Neurol. 2010; 67: 1307-15.)。

[0060] II. FXII抑制剂

[0061] 术语“因子XII”和“FXII”各自指因子XII和活化的因子XII(FXIIa)的任一个或两者。因此,“FXII抑制剂”包括FXII和FXIIa的任一个或两者的抑制剂。此外,抗-FXII抗体包括结合FXII和FXIIa的任一个或两者并抑制其的抗体。术语“FXII抑制剂”还意指包括连接于半衰期延长多肽的FXII的抑制剂,其在一些实施方案中包括接头。

[0062] 在一些实施方案中,FXII抑制剂是FXII的直接抑制剂。术语“直接”抑制剂的意指通过与FXII(或FXIIa)接触(例如,结合)起作用的抑制剂。相反地,间接抑制剂可在无需接触FXII(或FXIIa)蛋白的情况下起作用;例如,反义RNA可用于减少FXII基因的表达,但其不直接与FXII蛋白相互作用。因此,间接抑制剂,与直接抑制剂相反,在FXII蛋白的上游或下游起作用。直接抑制剂的一些实例示于下文中。FXII抑制剂通常是非内源性抑制剂;即,它们不是在具有炎症性脱髓鞘疾病的受试者的体内天然存在的抑制剂。

[0063] A. Infestin-4

[0064] 在一个实施方案中,本申请提供了包含infestin结构域4(“infestin-4”)的FXII抑制剂。最近,infestin-4据报道为活化FXII(FXIIa)的新型抑制剂。Infestin是一类来源于吸血昆虫骚扰锥蝽(已知引发Chagas病的寄生虫克氏锥虫的主要载体)的中肠的丝氨酸蛋白酶抑制剂。(Campos ITN等人32 Insect Biochem. Mol. Bio. 991-997, 2002; Campos ITN等人577 FEBS Lett. 512-516, 2004.)。该昆虫使用这些抑制剂阻止摄入的血液凝固。Infestin的全长前体多肽序列提供于图1(SEQ ID NO:1)中。Infestin基因编码导致可抑制凝血途径中的不同因子的蛋白质的4个结构域。具体地,结构域4编码为FXIIa的强抑制剂的蛋白(infestin-4)。Infestin-4已在小鼠中进行了施用,但无出血并发症。(WO 2008/098720; Hagedorn等人, Circulation 2010; 121: 1510-17.)。

[0065] 因此,在一个实施方案中,提供了包含infestin-4的变体的FXII抑制剂。在另一个实施方案中,FXII抑制剂包含infestin结构域4和任选地infestin结构域1、2和/或3。已知这些蛋白质为FXII的强效抑制剂。(参见WO 2008/098720;也参见Campos ITN等人577FEBS Lett.512-516,2004.)。在一个实施方案中,FXII抑制剂为(His)₆-标记的infestin-4构建体。在另一个实施方案中,FXII抑制剂是由白蛋白-接头-infestin-4组成的融合蛋白。在一个实施方案中,白蛋白-接头-infestin-4是Hagedorn等人Circulation 2010;117:1153-60中描述的rHA-Infestin-4蛋白。FXII的infestin抑制剂的实例描述于WO2008/098720和Hagedorn等人Circulation 2010;117:1153-60中。

[0066] 如此处所用,术语infestin的“变体”是指具有氨基酸突变的多肽,其中“突变”被定义为对野生型infestin-4序列的置换、缺失或添加,其中这样的变化不改变多肽抑制FXII的功能性能力。术语“变体”包括野生型或突变的infestin-4序列的片段。下文中提供了这样的变体的其它实例。

[0067] 在一个实施方案中,infestin-4变体包含来自野生型infestin-4序列的氨基末端的氨基酸序列VRNPCACFRNYV(SEQ ID NO:2的残基2-13)(参见图2中加以下划线的序列)和N末端氨基酸外部的至少1个和多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生型infestin-4序列的差异,和/或6个保守半胱氨酸残基,和/或至少70%的与野生型infestin-4序列的同源性。因此,在一些实施方案中,infestin-4的变体包含野生型infestin-4序列的氨基酸2-13的保守N末端区域,和在这些保守的N末端氨基酸之外的至少1个或多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生型infestin-4序列的差异。如此处所用,术语infestin变体的“N末端氨基酸外部”是指沿着所述变体的多肽链除包含序列VRNPCACFRNYV即来自SEQ ID NO:2的氨基酸2-13的连续氨基酸区段外的任何氨基酸。在另一个实施方案中,infestin-4变体包含6个保守半胱氨酸残基并且与野生型infestin-4序列具有至少70%的同源性。在一个实施方案中,6个保守半胱氨酸残基是野生型infestin-4序列SEQ ID NO:2的位置6、8、16、27、31和48上的氨基酸(参见图2)。在一个实施方案中,变体在位置48上包含最后一个保守半胱氨酸。在其它实施方案中,半胱氨酸残基的确切位置和彼此的相对位置可因infestin-4变体中的插入或缺失而从野生型infestin-4序列的位置6、8、16、27、31和48变化。然而,在这些实施方案中,infestin-4变体包含所有6个半胱氨酸并且可与野生型infestin-4序列具有70%、75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或这些百分比之间的任何百分比的同源性。

[0068] 在一个实施方案中,FXII抑制剂包含野生型infestin-4多肽序列的变体(SEQ ID NO:2),其中变体包含SEQ ID NO:2的N末端氨基酸2-13;在所述N末端氨基酸外的至少一个或多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生型infestin-4序列的差异;6个保守半胱氨酸残基;和与野生型infestin-4序列至少70%的同源性。

[0069] 在infestin-4变体实施方案中,infestin-4的变体的特征在于其抑制FXII。抑制FXII的功能性活性可以例如通过体外和/或体内表征来评估,所述表征包括测试FXII酶活性的抑制、延长的凝血时间即活化部分凝血活酶时间(aPTT;阐明凝血的内源性途径的临床凝血测试)的直接测定或评价凝血的体内法。

[0070] infestin-4变体的其它实例为SPINK-1突变体,其描述于下文中。

[0071] B.SPINK-1突变体

[0072] 一个实施方案涉及用于人的治疗性用途的FXII抑制剂。可使用与infestin-4具有高度相似性的人蛋白。例如,与Infestin-4具有最高相似性的人蛋白为SPINK-1,在胰腺中表达的Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂(也称为胰腺分泌胰蛋白酶抑制剂,PSTI)。Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族是众多丝氨酸蛋白酶抑制剂家族之一。已描述了来自不同物种的许多蛋白质。(Laskowski M和Kato I,49Ann.Rev.Biochem.593-626,1980.)

[0073] 基于野生型SPINK-1序列(SEQ ID NO:3),可产生不同的变体以增加SPINK-1序列与Infestin-4的同源性。在一个实施方案中,将SPINK-1突变以包含SEQ ID NO:2的N末端氨基酸2-13,所述序列被认为对于FXII抑制性功能是非常重要的。称为K1的多肽序列示于SEQ ID NO:4和图2中。

[0074] 在一个实施方案中,突变的SPINK-1的变体也包含野生型infestin-4序列的N末端氨基酸2-13(SEQ ID NO:2),和在所述N末端氨基酸外部的至少1个和多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生型SPINK-1序列的差异以及增加变体与野生型infestin-4序列的同源性。在另一个实施方案中,突变的SPINK-1的变体包含6个保守半胱氨酸残基并且与野生型SPINK-1序列具有至少70%的同源性。突变可以是置换、缺失或添加。如上所定义的,术语“在N末端氨基酸外部”是指沿着所述变体的多肽链除由序列VRNPCACFRNYV即SEQ ID NO:2的氨基酸2-13组成的连续氨基酸区段外的任何氨基酸。术语“变体”包括所述突变的SPINK-1序列的片段。在一个实施方案中,6个保守半胱氨酸残基可以是位于野生型SPINK-1序列的位置9、16、24、35、38和56上的氨基酸(SEQ ID NO:3,参见图2)。在一个实施方案中,变体包含最终的保守半胱氨酸。在另一个实施方案中,半胱氨酸的确切位置和彼此的相对位置可因SPINK-1变体中的插入或缺失而导致的从野生型SPINK-1序列的位置9、16、24、35、38和56改变。然而,在这些实施方案中,SPINK-1变体包含所有6个半胱氨酸。在实施方案中,SPINK-1变体的特征还在于其抑制FXII。

[0075] 在一个实施方案中,FXII抑制剂包含SPINK-1(SEQ ID NO:3)的变体,其中SPINK-1变体包含SEQ ID NO:2的N末端氨基酸2-13;在所述N末端氨基酸外部的至少1个和多至5个氨基酸突变,所述突变导致与野生型SPINK-1序列的差异以及增加变体与野生型infestin-4序列的同源性;6个保守半胱氨酸残基;和与野生型SPINK-1序列至少70%的同源性。

[0076] 给出SPINK-1变体的实例,其被命名为K1、K2和K3(分别地SEQ ID NOS:4、5和6)。在SPINK-1变体K2和K3中,相对于K1在N末端外产生其它氨基酸置换,以增加与infestin-4的同源性,其中变体的特征还在于它们抑制FXII活性。参见W0 2008/098720。图2显示这些变体的氨基酸序列和对SPINK-1野生型序列的改变的程度。在SPINK-1变体K3的情况下,5个氨基酸置换增加与infestin-4的同源性。因此在实施方案中,SPINK-1变体可与野生型SPINK-1序列具有70%、75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或这些百分比之间的任何百分比的同源性。

[0077] C. 其它FXII抑制剂

[0078] FXII的其它抑制剂,包括FXII和FXIIa的抑制剂,描述于W02006/066878中。因此,在一些实施方案中,FXII抑制剂是抗凝血酶111(AT 111)、血管紧张素转化酶抑制剂、C1抑制剂、抑肽酶、 α -1蛋白酶抑制剂、抗蛋白酶素([(S)-1-羧基-2-苯乙基]-氨甲酰基-L-Arg-L-Val-Arginal)、Z-Pro-Pro-乙醛-二甲基醋酸酯、DX88(Dyax Inc., 300Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; Williams A和Baird LG, 29Transfus Apheresis

Sci. 255-258, 2003中引用的)、亮抑酶肽、脯氨酰寡肽酶的抑制剂例如Fmoc-Ala-Pyr-CN、玉米-胰蛋白酶抑制剂、牛胰蛋白酶抑制剂的突变体、ecotin、黄盖蝶抗凝蛋白、笋瓜胰蛋白酶抑制剂-V, 包括笋瓜同效抑制剂或Hamadarin (如由Isawa H等人, 277J. Biol. Chem. 27651-27658, 2002公开的)。

[0079] 在其它实施方案中, FXII抑制剂为H-D-Pro-Phe-Arg-氯甲基酮(PCK)。(Tans等人, Eur. J. Biochem. 1987; 164: 637-42; Kleinschnitz等人, J. Exp. Med. 2006; 203: 513-8.)。

[0080] 在其它实施方案中, FXII抑制剂为美国专利No. 6, 613, 890中第4至8栏中公开的淀粉样蛋白前体蛋白的Kunitz蛋白酶抑制剂结构域类似物。

[0081] D. FXII抗体

[0082] 在其它实施方案中, FXII抑制剂为结合FXII并抑制FXII激活和/或活性的抗-FXII抗体。抗-FXII抗体已描述于例如WO 2006/066878和Ravon等人, 1Blood 4134-43, 1995中。针对人因子XII的其它单克隆抗体(mAb)包括由Pixley等人描述的B7C9mAb (J. Biol. Chem. 1987; 262, 10140-45), 由Small等人描述的mAb (Blood 1985; 65: 202-10); 由Nuijens等人描述的mAb F1和F3 (J. Biol. Chem. 1989; 264: 12941-49); WO89/11865中描述的抗FXII的轻链的B6F5、C6B7和D2E10mAb; WO90/08835中描述的相对于FXII选择性结合FXIIa-β的mAb; 和WO91/17258中描述的抗-FXII抗体OT-2。

[0083] 另外的抗-因子XII/FXIIa单克隆抗体及其抗原结合片段描述于2011年7月22日提交的美国临时申请no. 61/510, 801 (将其通过引用并入本文)中。那些抗体具有为对于人因子XII的结合亲和力2倍以上的对于人因子XIIa-β的结合亲和力, 并且能够抑制人因子XIIa的胺裂解酶活性。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段具有下列特征的一个或多个: (a) 结合鼠FXII/FXIIa; (b) 包含与SEQ ID NO: 7的序列具有超过85%的同一性的重链可变(VH)区; (c) 包含与SEQ ID NO: 8的序列具有超过85%的同一性的轻链可变(VL)区; (d) 包含与SEQ ID NO: 9的序列具有至少80%的同一性的重链CDR1, 和/或与SEQ ID NO: 10的序列具有至少60%的同一性的重链CDR2, 和/或与SEQ ID NO: 12的序列具有至少80%的同一性的重链CDR3; (e) 包含与SEQ ID NO: 14具有至少50%的同一性的轻链CDR1, 和/或SEQ ID NO: 15的轻链CDR2, 和/或具有序列A-X₁-W-X₂-X₃-X₄-X₅-R-X₆-X₇的轻链CDR3, 其中X₁可为A或S, X₅可为L或V, 其它X_n可为任意氨基酸 (SEQ ID NO: 17); (f) 以好于10⁻⁸M的K_D结合人因子XIIa-β; (g) 与infestin-4竞争对于人因子XIIa-β的结合; 或(h) 为人IgG或其变体, 优选人IgG4或其变体。

[0084] 在其它实施方案中, 抗-FXII抗体为结合人FXII的IgG抗体, 并且包含(a) 含有SEQ ID NO: 9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO: 11中所示的重链CDR2和SEQ ID NO: 13中所示的重链CDR3的VH区; 和/或(b) 含有SEQ ID NO: 14中所示的轻链CDR1、SEQ ID NO: 15中所示的轻链CDR2和SEQ ID NO: 17所示的轻链CDR3的VL区。包含SEQ ID NO: 11的重链CDR2包含序列GIX₁X₂X₃X₄X₅X₆TVYADSVKG, 其中X₁为R、N或D, X₂为P、V、I或M; X₃为S、P或A; X₄为G、L、V或T; X₅可为任意氨基酸, 优选地X₅为G、Y、Q、K、R、N或M; 并且X₆为T、G或S。包含SEQ ID NO: 13的重链CDR3包含序列ALPRSGYLX₁X₂X₃X₄YYYALDV, 其中X₁为I、M或V; X₂为S或K; X₃为P、K、T或H; 并且X₄为H、N、G或Q。包含SEQ ID NO: 17的轻链CDR3包含序列AX₁WX₂X₃X₄X₅RX₆X₇, 其中X₁为A或S; X₂为D、Y、E、T、W、E或S; X₃为A、N、I、L、V、P、Q或E; X₄为S、D、P、E、Q或R; X₅为L或V; X₆为G、L或K; 并且X₇为V、A、D、T、M或G。

[0085] 在其它实施方案中,抗-FXII抗体的抗原结合片段是结合人FXII的IgG抗体的片段,其包含(a)包含SEQ ID NO:9中所示的重链CDR1、SEQ ID NO:10所示的重链CDR2和SEQ ID NO:12所示的重链CDR3的VH区;和/或(b)包含SEQ ID NO:14所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:15所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:16所示的轻链CDR3的VL区。

[0086] 在一个实施方案中,抗-FXII抗体或其抗原结合片段是实施例3中使用的抗体“3F7”。3F7的可变区和CDR的序列示于表1中。

[0087] 表1.

区域	氨基酸序列
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYIMQWVRQ APGKGLEWVSGIRPSGGTTVYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARALPRSGYLISPHYYYYALDV WGQGTTVTVSS(SEQ ID NO: 7)
VL	QSELTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGRNYVYQYQVP GTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLRSED EADYYCAAWDASLRGVFGGGTKLTVLG(SEQ ID NO: 8)
HCDR 1 (Kabat31-35)	KYIMQ(SEQ ID NO: 9)
HCDR 2 (Kabat50-65)	GIRPSGGTTVYADSVKG(SEQ ID NO: 10)
HCDR 3 (Kabat95-102)	ALPRSGYLISPHYYYYALDV(SEQ ID NO: 12)
LCDR 1 (Kabat24-34)	SGSSSNIGRNYVY(SEQ ID NO: 14)
LCDR 2 (Kabat50-56)	SNNQRPS(SEQ ID NO: 15)
LCDR 3 (Kabat89-97)	AAWDASLRGV(SEQ ID NO: 16)

[0089] 在其它实施方案中,抗-FXII抗体或抗原结合片段选自亲和力成熟的(相对于3F7)抗体VR115、VR112、VR24、VR110、VR119。

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
3F7	9	10	12	14	15	16
VR119	9	11	12	14	15	16
VR112	9	11	12	14	15	16
VR115	9	11	12	14	15	16
VR24	9	10	12	18	15	16
VR110	9	11	12	14	15	16

[0091] 如上所述,SEQ ID NO:11是简并序列。VR119包含SEQ ID NO:11,其中X₁为N,X₂为V,X₃为P,X₄为L,X₅为Y;并且X₆为G。VR112包含SEQ ID NO:11,其中X₁为N,X₂为V,X₃为P,X₄为V,X₅

为Q,并且X₆为G。VR115包含SEQ ID NO:11,其中X₁为D,X₂为I,X₃为P,X₄为T,X₅为K并且X₆为G。VR110包含SEQ ID NO:11,其中X₁为D,X₂为M,X₃为P,X₄为T,X₅为K并且X₆为G。VR24包含唯一的LCDR1:SGSSEMTVHHYVY (SEQ ID NO:18)。

[0092] 在牵涉抗体CDR的实施方案中,按照KABAT编号系统定义CDR。(Kabat EA,Wu TT,Perry HM,Gottesman KS,Foeller C(1991),Sequences of proteins of immunological interest,第5版.U.S.Department of Health and Human services,NIH,Bethesda,MD.)。

[0093] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段为抗-因子XII/FXIIa单克隆抗体或其抗原结合片段,当以1:0.2的FXIIa-α对抗体的摩尔比使用时,其抑制因子XIIa-α超过40%,超过50%或超过60%。在一些实施方案中,当以1:0.5的FXIIa-α对抗体的摩尔比使用时,抗体或其抗原结合片段抑制因子XIIa-α超过80%,超过85%或超过90%。在一个实施方案中,抗体以1:0.5的摩尔比实现对FXIIa-α的完全抑制。在一个实施方案中,FXIIa-α为人因子XIIa-α。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有与抗体3F7至少相当的对于人FXIIa的亲和力。

[0094] 如上所论述的,“抗-FXII抗体”包括结合FXII和FXIIa的任一个或两者并抑制其的抗体。在一个实施方案中,抗体可以以全长Ig、Fab、F(ab)₂、Fv、scFv的形式或其它形式或其变体存在。抗体可以是单克隆或多克隆抗体。抗体的特征可在于同种型为IgM,IgD,IgA,IgG或IgE或其任意亚类,例如IgG₁或其变体。抗体可来自哺乳动物物种,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、山羊、仓鼠或猴。抗体可以是人源化的或CDR移植的。抗体可以被突变或修饰来改变免疫原性、半衰期,或赋予与治疗性抗体相关的其它有利性质。在一个实施方案中,抗体为抗-FXII抗体,其结合FXII(其中,“FXII”包括FXII和FXIIa)的重链或轻链上的表位,例如中和表位。抗体对于对FXII的结合可以是高亲和性和/或高亲合力的。可将抗体缀合于多肽、核酸或小分子。

[0095] 在另一个实施方案中,FXII抑制剂为蛋白质、表位、核酸或小分子。术语“小分子”是指低分子量化合物。小分子可以是例如小于1000道尔顿,从而允许扩散穿过细胞膜。小分子可的特征可在于其以高亲和力结合FXII。优选小分子是可从GI道被吸收的小分子。

[0096] E.连接于半衰期增强多肽的FXII抑制剂

[0097] 本申请的另一个方面提供了连接于半衰期增强多肽(HLEP)的FXII抑制剂。在一个实施方案中,FXII抑制剂为小的蛋白质。因此可预期如针对其它小的蛋白质所公布的快速肾清除。(Werle M和Bernkop-Schnurch A,Amino Acids 2006;30:351-367.)。一个解决多肽类化合物的短的血清半衰期的方法是反复地或通过连续输注注射多肽类化合物。另一个方法是增加多肽本身的血浆半衰期。例如,在一个实施方案中,将FXII抑制剂连接于半衰期延长蛋白。

[0098] “半衰期增强多肽”增加FXII抑制剂在患者或动物体内的半衰期。例如,白蛋白和免疫球蛋白及它们的片段或衍生物已被描述为半衰期增强多肽(HLEP)。Ballance等人(WO 2001/79271)描述了许多不同的治疗性多肽的融合多肽,所述治疗性多肽,当与人血清白蛋白融合时,经预测具有增加的体内功能半衰期和延长的贮存期限。

[0099] 术语“白蛋白”和“血清白蛋白”包括人白蛋白(HA)和其变体,给出了其完全成熟的形式(SEQ ID NO:19),以及来自其它物种的白蛋白及其变体。如本文中所用,“白蛋白”是指白蛋白多肽或氨基酸序列,或白蛋白变体,其具有白蛋白的一个或多个功能活性(例如生物

活性)。如本文中所用,白蛋白能够稳定或延长FXII抑制剂的治疗活性。白蛋白可来源于任何脊椎动物,尤其任何哺乳动物,例如人、猴、牛、绵羊或猪。非哺乳动物白蛋白包括但不限于来自母鸡和鲑鱼的白蛋白。连接有白蛋白的多肽的白蛋白部分可来自与治疗性多肽部分不同的动物。关于白蛋白融合蛋白的实例,参见WO 2008/098720。

[0100] 在一个实施方案中,白蛋白变体为至少10、20、40或至少70个氨基酸长或可包含15、20、25、30、50或更多个来自人白蛋白(HA)序列(例如,图3中所示的序列,SEQ ID NO:19)的连续氨基酸或可包含HA的特定结构域的部分或全部。白蛋白变体可包含氨基酸置换、缺失或添加,保守或非保守置换,其中这样的变化大体上不改变活性部位或活性结构域,所述活性部位或结构域赋予半衰期增强多肽的治疗活性。这些变体可共有70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或其间的任何百分比的同源性。

[0101] 在一个实施方案中,白蛋白变体包括片段或可由白蛋白的至少一个完整结构域或所述结构域的片段组成或可选择地包含所述结构域或其片段,所述结构域是例如结构域1(SEQ ID NO:19的氨基酸1-194)、结构域2(SEQ ID NO:19的氨基酸195-387)、结构域3(SEQ ID NO:19的氨基酸388-585)、结构域1+2(SEQ ID NO:19的1-387)、结构域2+3(SEQ ID NO:19的195-585)或结构域1+3(SEQ ID NO:19的氨基酸1-194+SEQ ID NO:19的氨基酸388-585)。每一个结构域本身由两个同源亚结构域即SEQ ID NO:19的残基1-105、120-194、195-291、316-387、388-491和512-585组成,柔性亚结构域接头区域包含残基Lys106至Glu119、Glu292至Val315和Glu492至Ala511。

[0102] 在另一个实施方案中,在结构上或进化上与白蛋白相关的其它蛋白可用作HELP,包括但不限于 α -甲胎蛋白(WO 2005/024044;Beattie and Dugaiczky,20Gene 415-422,1982)、维生素E结合蛋白(Lichenstein等人269J.Biol.Chem.18149-18154,1994)和维生素D结合蛋白(Cooke和David,76J.Clin.Invest.2420-2424,1985)。它们的基因代表定位至人、小鼠和大鼠中相同染色体区域的具有结构和功能相似性的多基因簇。白蛋白家族成员的结构相似性表明它们可用作HELP。例如, α -甲胎蛋白已被要求用来在体内延长连接的治疗性多肽的半衰期(WO 2005/024044)。可使用能够稳定或延长治疗活性的这样的蛋白或其变体,其可来源于任何脊椎动物,尤其任何哺乳动物,例如人、猴、牛、绵羊或猪,或非哺乳动物白蛋白包括但不限于来自母鸡和鲑鱼(参见WO 2008/098720)。这样的变体在长度上可具有10个或更多个氨基酸,或可包含各自蛋白质序列的约15、20、25、30、50或更多个连续氨基酸。白蛋白家族成员融合蛋白可包括天然存在的多态型变体。

[0103] 在一个实施方案中,单个-或多个-(例如,2-4)聚乙二醇(PEG)部分可用于延长半衰期。可通过可获得的任何PEG化反应进行PEG化。用于制备PEG化蛋白产物的方法通常包括(a)在其中可使多肽连接于一个或多个PEG基团的条件下将多肽与聚乙二醇(例如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应;和(b)获得反应产物。一般而言,最佳反应条件将基于已知参数和期望的结果来逐个地测定。存在许多本领域已知的PEG连接法。参见,例如,EP 0401384;Malik等人,Exp.Hematol.,20:1028-1035(1992);Francis,Focus on Growth Factors,3(2):4-10(1992);EP 0154316;EP 0401384;WO 92/16221;WO 95/34326;美国专利No.5,252,714。

[0104] 在另一个实施方案中,免疫球蛋白(Ig)或其变体可用作HELP,其中变体包括片段。

在一个实施方案中,使用Fc结构域或免疫球蛋白恒定区的部分。恒定区可以是IgM、IgG、IgD、IgA或IgE免疫球蛋白的恒定区。治疗性多肽部分通过抗体的铰链区或肽接头连接于Ig,所述铰链区或肽接头可以是可切割的。几个专利和专利申请描述了治疗性蛋白至免疫球蛋白恒定区的融合,以延长治疗性蛋白的体内半衰期(US2004/0087778、WO 2005/001025、WO 2005/063808、WO 2003/076567、WO 2005/000892、WO 2004/101740、US 6,403,077)。因此,另一个实施方案将使用这样的免疫球蛋白序列(例如免疫球蛋白的Fc片段及其变体)作为HLEP。可将FXII的抑制剂融合于作为HLEP的Fc结构域或免疫球蛋白恒定区的至少部分,所述FXII的抑制剂可在原核或真核宿主细胞例如细菌、酵母、植物、动物(包括昆虫)或人细胞中或转基因动物(WO2008/098720)中产生为重组分子。

[0105] 一个SPINK突变体Fc融合蛋白的实例SPINK-K2-Fc融合蛋白描述于WO2008/098720。

[0106] F. 接头

[0107] 在一个实施方案中,可在治疗性多肽与HLEP之间引入间插肽类接头。在一个实施方案中,引入可切割的接头,特别地如果HLEP干扰(例如通过位阻)治疗性肽的特定活性的话。在某些实施方案中,通过酶例如内源性、外源性或共同凝血途径的凝血蛋白酶切割接头。内源性途径的凝血蛋白酶是接触活化途径中的蛋白酶,包括例如FXIIa、FXIa或FIXa。在一个实施方案中,接头被FXIIa切割。内源性途径的蛋白酶包括组织因子途径中的蛋白酶例如FVIIa。共同途径的蛋白酶包括参与血纤蛋白原至血纤蛋白的转化的蛋白酶,例如FXa、FIIa和FXIIIa。

[0108] G. 治疗性制剂和施用

[0109] FXII抑制剂或其变体可具有大于80%或大于95%、96%、97%、98%或99%的纯度。在一个实施方案中,变体可具有相对于污染性大分子例如其它蛋白质和核酸大于99.9%的纯度的药用纯状态,并且不含传染原和热原试剂。

[0110] 可将纯化的FXII抑制剂溶解于常规生理上相容的含水缓冲液,任选地向所述缓冲液中添加药物赋形剂以提供用于预防、治疗或改善患者的炎症性脱髓鞘疾病的影响的药物制剂。这样的药物载体和赋形剂以及适当的药物制剂在本领域是已知的。参见,例如,Kibbe等人Handbook of Pharmaceutical Excipients, (第3版, Pharmaceutical Press), 2000。可以以冻干形式或稳定的可溶形式配制药物组合物。可通过多种本领域已知的方法冷冻干燥多肽。通过添加一种或多种药学上可接受的稀释剂例如无菌注射用水或无菌生理盐溶液来在使用之前重建冻干制剂。

[0111] 通过任何药学上适当的施用装置将FXII抑制剂的制剂递送至患者。各种递送系统是已知的,并且可用于通过任何方便的途径施用组合物。可全身性地例如胃肠外施用组合物。如本文中所用,术语“胃肠外”包括静脉内、皮下、肌内、动脉内和气管内注射;以及滴注、喷雾施用和输注技术。可按照已知方法,以快速浓注或以恒量输注形式静脉内或皮下施用胃肠外制剂。对于胃肠外使用是公知的优选液体载体包括无菌水、盐水、含水葡萄糖、糖溶液、乙醇、甘油和油。为了全身性使用,治疗性蛋白可被配制来用于静脉注射管或动脉注射管。可通过输注连续地施用或通过单次快速静脉注射来施用制剂。

[0112] 在一些实施方案中,通过鞘内注射或通过颅内注射施用制剂,以便获得至脊髓和脑的直接抵达。在这些实施方案中,可专门地配制制剂;例如,制剂可以不含防腐剂。

[0113] 在一些实施方案中,通过鼻内给药来施用制剂。已报道鼻内递送能够使病毒和大分子直接进入脑脊髓液(CSF)或CNS。Mathison等人J. Drug Target 1998;5:415-41;Chou等人Biopharm Drug Dispos.1997;18:335-46;Draghia等人,Gene Ther.1995;2(6):418-235。在一个实施方案中,包含编码为蛋白质的任意FXII抑制剂的基因的载体例如腺病毒载体可通过嗅觉受体神经元进行递送以获得编码的蛋白质在脑中表达。Draghia等人,Gene Ther.1995;2(6):418-23。

[0114] 用于口服施用的片剂和胶囊可包含常规赋形剂例如粘合剂、填充剂、润滑剂或湿润剂等。口服液体制剂可以以含水或油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆剂、酏剂等形式存在,或可以提供为干燥产物,以利用水或其它适当的媒介物重建来进行使用。这样的液体制剂可包含常规添加剂,例如悬浮剂、乳化剂、非含水媒介物和防腐剂。一些制剂包含缓释系统例如贴剂。

[0115] FXII抑制剂的剂量可取决于许多因素例如适应症、制剂或施用模式,并且可在每一个各自的适应症的临床前和临床试验中进行测定。例如,在一个实施方案中,FXII抑制剂的剂量为0.1mg/kg、1mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、200mg/kg、500mg/kg、1000mg/kg或之间的任何剂量,或0.1-1000mg/kg,或1-1000mg/kg,或1-500mg/kg,或50-500mg/kg、50-200mg/kg,或100-200mg/kg或之间的任何剂量范围。

[0116] 在那些牵涉抗-FXII抗体或抗原结合片段的治疗有效剂量的实施方案中,治疗有效剂量为在需要治疗的患者或受试者中产生大致积极的治疗效应的剂量。治疗有效剂量通常在约0.01至100mg/kg、约0.01至50mg/kg、约0.1至30mg/kg、约0.1至10mg/kg、约0.1至5mg/kg、约0.1至2mg/kg或约0.1至1mg/kg的范围中或之间的任何剂量范围中,或上文中或实施例中提供的FXII抑制剂的剂量之一。

[0117] 治疗可包括提供单次剂量或多份剂量。如果需要多份剂量,可每日1次、每隔一日1次、每周1次、每二周1次、每月1次或每二月1次或按需施用它们。还可使用缓慢且持续地释放抗体或其抗原结合片段的贮积物(depository)。治疗有效剂量可以是抑制受试者的FXIIa至少50%,优选至少60%、70%、80%、90%,更优选至少95%、99%或甚至100%(或之间的任何百分比)的剂量。

[0118] 可单独地或与其它治疗剂结合地施用FXII抑制剂。可共配制这些试剂,或可将这些试剂作为单独的制剂共施用或分开施用以及通过相同的施用途径或不同的施用途径施用。取决于因素例如其它医学状况或疗法,FXII抑制剂的施用方案或剂量还可在具有相同适应症或不同适应症的个体患者之间变化。

[0119] 通过下列实施例进一步举例说明实施方案,所述实施例不应当解释为限定。根据公开的实施方案的说明和实践,其它实施方案对于本领域技术人员来说将是显然的。将本申请从始至终引用的所有参考资料、专利和公布的专利申请的内容通过引用并入本文。

实施例

[0120] 实施例1:作为多发性硬化的新型靶的血浆凝血系统

[0121] 初步研究显示初期止血和二期止血牵涉MS的炎症性神经退行性病变。例如,最近已在EAE动物模型中显示已被鉴定为Ca²⁺-依赖性血小板活化的关键分子STIM1和STIM2代表炎症反应和神经退行性病变的重要病理生理学决定因子。(Schuhmann等人,

J. Immunol. 2010;184:1536-42.)。此外,在MS患者的中央血管和脑实质中发现了血纤蛋白原和血纤蛋白的沉积。(Sobel&Mitchell, Am. J. Pathol. 1989;135:161-68; Claudio等人, Acta Neuropathol 1995;90:228-38; Marik等人, Brain 2007;130:2800-15.)。血纤蛋白是所谓的血浆凝血系统的终产物,而血浆凝血系统由外源性和内源性系统组成。凝血因子XII (FXII) 是内源性凝血级联的起始点,其最初导致FXI的激活。同时,其活化促炎接触(激肽)系统,其终点是缓激肽的形成。

[0122] 我们的工作显示缓激肽受体B1R在EAE模型中是炎症细胞侵入的重要调节者。(Göbel等人, J. Autoimmun 2011;36:106-14.)。B1R缺陷型小鼠经历不太严重的EAE。类似地,利用B1R的选择性拮抗剂处理的野生型小鼠相较于未处理小鼠也经历更小的疾病最大程度。相比之下,通过破坏B2R基因阻断缓激肽受体B2R不改变EAE疾病过程。有趣地,B2R介导缓激肽的大部分效应,尽管B1R和B2R都介导组织损伤后的经典炎症过程。此外,导致缓激肽体内活性的机制还不清楚,因为缓激肽可被至少两个途径激活:内源性凝血途径和另一个途径(其必须是不依赖于FXII的,因为其甚至在FXII敲除小鼠中发生)。(Schmaier AH, Int. Immunopharmacol. 2008;8:161-65.)

[0123] 为了测试FXII是否也促成EAE,通过用200µg MOG₃₅₋₅₅免疫10-12周龄雌性C57Bl/6、FXII-或FXI-缺陷型小鼠来诱发EAE。C57Bl/6MOG₃₅₋₅₅小鼠模型通常用于治疗性化合物的临床前验证。(Krishnamoorthy&Wekerle, Eur. J. Immunol 2009;39:2031-35.)。EAE在该模型中的过程与MS的原发性进行型形式相似,因为一旦诱发,疾病不缓解。用MOG补充完全弗氏佐剂(CFA)以获得1mg/ml乳剂,在深度麻醉的小鼠的肋腹的2个不同部位皮下注射2x100µl。在免疫当天和2天后注射百日咳毒素(400ng, Alexis, San Diego, CA)。将所有动物保持在标准条件下,并随意接触水和食物。

[0124] 还使用通过每日静脉内注射的FXII拮抗剂H-D-Pro-Phe-Arg-氯甲基酮(PCK) (8µg/g; Bachem) 进行药理调制。PCK不可逆地抑制活化FXII (FXIIa) 的胺裂解酶活性和FXII的血浆激肽释放酶介导的激活。(Tans等人, Eur. J. Biochem. 1987;164:637-42; Kleinschultz, J Exp Med. 2006Mar 20;203(3):513-8.)

[0125] 由双盲研究者使用下列评分系统监控EAE的临床过程:0级,无异常;1级,无力的尾尖;2级,无力的尾;3级,中等后肢透乏力;4级,完全后肢乏力;5级,轻度后肢轻瘫;6级,后肢轻瘫;7级,重度后肢瘫痪或截瘫;8级,四肢轻瘫;9级,四肢瘫痪或濒死前(premoribund)状态;10级,死亡。具有高于7的分数的动物被无痛致死,并以一致的分数继续进行直至实验结束。

[0126] 在FXII缺陷型小鼠中,最大发病率显著减小。(图4A)。在利用PCK的药理学阻断中观察到相似结果。(图4C, 4D.)。即使当在第12天开始治疗(此时动物已显示EAE症状),PCK已起作用(图4D)。但在FXI缺陷型小鼠,EAE疾病过程与在野生型对照小鼠的EAE疾病过程相似。(图4B.)。由于FXI是FXII的直接下游并且被FXIIa激活,因此这些结果表明FXII在内源性凝血级联中的作用在EAE模型中不导致观察到的保护作用。

[0127] 除了疾病评分的减少外,炎症病灶的数目以及脱髓鞘和轴突损伤在FXII缺陷型动物中也显著减少。图5描述了对照小鼠(左条块)、PCK处理小鼠(中间条块)和FXII-/-小鼠(右条块)中的炎症病灶的数目(图5A)、脱髓鞘区域/切片(图5B)和轴突计数(图5C)。为了进行定量,利用具有CCD照相机(Visitron Systems;Tuchheim, Germany)的显微镜

(Axiophot2, Zeiss; Oberkochen, Germany) 以盲方式检查染色的切片。利用MetVue软件 (Molecular Devices; Downingtown, USA) 对5个随机选择的样品进行炎症病灶 (H&E)、脱髓鞘区域 (LFB) 和细胞计数。在确定的病变中分析轴突的数目。使用ImageJ (NIH, USA) 测量荧光强度。对于每一个条形图, 显示了对照 (Con) 与PCK处理小鼠之间的组织学比较的实例。箭头显示炎症 (图5A)、脱髓鞘 (图5B) 和轴突损伤 (图5C) 的区域。

[0128] 体外分析也显示改变的免疫反应 (图5D和5E)。在疾病最大时和在EAE诱发后50天从免疫小鼠分离脾细胞, 利用MOG₃₅₋₅₅肽 (10mg/ml) 或CD3/CD28珠粒 (细胞对珠粒比率2:1) 刺激所述脾细胞。为了进行图5D中显示的增殖测定, 将 1×10^5 个脾细胞在含有10mM HEPES, 25mg/ml庆大霉素, 50mM巯基乙醇, 5%FCS, 2mM谷氨酰胺和1%非必需氨基酸 (Cambrex; Verviers, Belgium) 的1ml DMEM中培养3天, 利用CD3/CD28珠粒 (细胞对珠粒比率2:1; Dynal Biotech, Hamburg, Germany) 或10mg/ml MOG₃₅₋₅₅进行刺激。添加³H胸苷 (Amerham; Piscataway, NJ), 进行最后14小时, 在β-闪烁计数器 (TopCount NXT; PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Germany) 上测量放射性。以一式四份进行实验。

[0129] 如图5D中所示, 利用CD3/CD28珠粒刺激的对照 (左条块)、PCK处理的 (中间条块) 和FXII^{-/-}小鼠 (右条块) 脾细胞间的增殖无显著差异。当将MOG₃₅₋₅₅肽用于刺激增殖时, 在对照与PCK处理小鼠之间但非对照与FXII^{-/-}小鼠之间存在显著差异。

[0130] 还按照制造商的说明书, 通过ELISA (R&D Systems; Wiesbaden, Germany) 评估MOG再刺激脾细胞的上清液的IFN γ 、IL-17、IL-4和IL-6蛋白水平。图5E中提供的结果显示来自PCK处理 (中间条块) 和FXII^{-/-}小鼠 (右条块) 的脾细胞的IL-17、TNF α 和IL-6的产量相较于对照减少。IFN的水平无显著差异。

[0131] 总之, 这些结果表明FXII的抑制导致导致与内源性凝血级联的变化无关的外周免疫反应的改变。

[0132] 实施例2: FXII的蛋白质抑制剂也在神经自身免疫炎症的原发性进行型模型中抑制疾病的临床体征

[0133] rHA-Infestin-4, FXII的另一种抑制剂, 在实施例1中详细描述EAE模型中也具有活性。在本研究中, 以200 μ g/g的剂量通过每日1次静脉内注射, 利用rHA-Infestin-4 (包含通过接头融合于infestin 4结构域的人白蛋白的蛋白) (其已描述于Hagedorn等人 Circulation 2010; 117: 1153-60中) 处理小鼠。

[0134] 如图6A中显示的, rHA-Infestin-4还在疾病过程早期减少EAE分数。并且如研究中于PCK处理的小鼠和FXII^{-/-}小鼠的研究中看到的, 利用rHA-Infestin-4的处理导致相对于对照IL-17产量的显著减少 (图6B)。

[0135] 这些结果提供了FXII的药理学阻断提供了用于MS的治疗的新的可选择的抗-炎症策略的另外证据。

[0136] 实施例3: 抗-FXII抗体治疗在神经自身免疫炎症的复发型模型中抑制疾病的临床体征

[0137] 抗-因子XII抗体也用于在第二EAE模型利用PLP肽 (髓磷脂蛋白脂质蛋白质) 免疫的雌性SJL小鼠中测试FXII的作用。该EAE小鼠模型复制MS的许多临床和组织病理学体征, 包括运动神经元功能的退化。与C57Bl/6MOG₃₅₋₅₅模型一样, 利用PLP免疫的SJL小鼠是用于治疗性化合物的临床前验证的可接受的模型。(Krishnamoorthy & Wekerle, Eur. J. Immunol

2009;39:2031-35.)。然而,SJL PLP模型也经历缓解和复发,如在MS的复发缓解型形式中发生的。

[0138] 通过用100 μ g的于完全弗氏佐剂(CFA) (Difco,BD San Diego,CA,USA) 中乳化的PLP肽(139-151) (Mimotopes,Clayton,Vic,Australia) 皮下免疫,随后在第0天静脉内施用200ng百日咳毒素(Sigma-Aldrich,St Louis,MO,USA) 来在8-12周龄雌性SJL小鼠中诱发EAE。在第“-1”天(即,EAE诱发注射前一天),和在诱发后第1、3、6、8、10、13和15天,给对照动物皮下注射200 μ g的同种型对照单克隆抗体,而实验组接受抗-FXII mAb (3F7)。从第0至15天监控疾病。如Langrish等人,J Exp Med.2005;201:233-40中所述,评估临床分数,对于每一只小鼠最大分数为6。所有动物方法获得CSL动物伦理委员会的批准。

[0139] 利用中和抗-FXII单克隆抗体(mAb) 处理小鼠在该复发型模型中抑制了EAE的临床进展(图7)。抑制在疾病的早期阶段是最有效的。

[0140] 为了评价FXII阻断在体内对促炎细胞因子反应的作用,在第9天对动物进行放血,按照制造商的说明书在Luminex 200仪(Austin,TX,USA) 上通过Luminex测定(Millipore,Billerica,MA,USA) 对收获的血清进行细胞因子分析。抗-FXII抗体治疗导致促炎细胞因子至血液中的释放减少。如图8中所示,抗-FXII降低GM-CSF、IFN γ 、TNF α 和IL-1 β 的水平。

[0141] 巨噬细胞和树突细胞(DC) 在EAE和MS炎性病变中是突出的,并且在介导组织损伤中具有作用。它们通过促炎细胞因子的产生、抗原至自身反应性淋巴细胞的呈递起作用,并且在引起直接髓磷脂损害的活性氧的产生中起作用(Graham等人,2009)。趋化素是作为酶原在血液内循环的分子,其被包括纤溶酶、中性粒细胞弹性蛋白酶的丝氨酸蛋白以及更低程度上被FVIIa激活。然而,FXIIa是主要激活物(Qu和Chaikof,2010)。激活的趋化素是表达趋化因子样受体1(CMKLR1) (也称为ChemR23) 的高效化学吸引剂。该受体由类浆细胞树突细胞(pDC)、组织驻留型巨噬细胞、单核细胞和NK细胞高度表达(Hart和Greaves,2010)。由Graham等人(2009) 进行的研究已显示趋化素受体CMKLR1或Chem23的小鼠敲除在EAE实验中具有总体更低的临床分数。因此,至少在复发型EAE模型中,利用抗体阻断FXII的作用可能可以至少部分地通过减少活性趋化素的量,从而在EAE实验中产生治疗效应来起作用。

[0142] 根据本文中公开的发明的说明和实践,本发明的其它实施方对于本领域技术人员将是很显然的。本说明书和实施例仅意欲作为示例来考虑,本发明的实际范围和精神由下列权利要求显示。

<110> 德国杰特贝林生物制品有限公司等
 <120> 用于治疗神经炎症性疾病的因子XII抑制剂
 <130> A189
 <140> EP2012153341.8
 <141> 2012-01-31
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> *Triatoma infestans*
 <400> 1

Met Arg Tyr Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ala Phe Ser Ala Val Ser
1 5 10 15

Ala Glu Lys Lys Asp Pro Pro Cys Val Cys Pro Leu Ile Trp Lys Pro
20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Gly Gln Thr Tyr Pro Ser Glu Cys Ile Leu Asn
35 40 45

Cys Val Lys Tyr Ala Leu Lys Lys Asp Ile Lys Val Ala Tyr Gln Gly
50 55 60

[0001]

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

Gly Trp Lys Gly Pro Cys Glu Cys Pro Arg Ala Leu His Arg Val Cys
85 90 95

Gly Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Ser Asn Pro Cys Thr Leu Asn Cys Ala
100 105 110

Lys His Glu Arg Lys Ser Asp Leu Val Gln Val His Glu Gly Pro Cys
115 120 125

Ser Pro Asp Glu His Glu Phe Glu Asp Pro Cys Glu Cys Asp Asn Lys
130 135 140

Phe Asp Pro Val Cys Gly Thr Gly Glu Val Thr Tyr Arg Asn Leu Cys
145 150 155 160

His Leu Glu Cys Ala Thr Phe Thr Thr Ser Pro Gly Val Glu Val Asp
165 170 175

Tyr Glu Gly Glu Cys Leu Ala Glu Thr Val Leu Leu Glu Glu Asn His
180 185 190

Cys Ala Cys Pro Arg Val Leu His Arg Val Cys Gly Ser Asp Gly Asn
195 200 205

Thr Tyr Ser Asn Pro Cys Thr Leu Asp Cys Ala Lys His Glu Gly Lys
210 215 220

Pro Asp Leu Val Gln Val His Glu Gly Pro Cys Asp Pro Asn Asp His
225 230 235 240

Asp Phe Glu Asp Pro Cys Glu Cys Asp Asn Lys Phe Glu Pro Val Cys
245 250 255

Gly Thr Asp His Ile Thr Tyr Ser Asn Leu Cys His Leu Glu Cys Ala
260 265 270

Ala Phe Thr Thr Ser Pro Gly Val Glu Val Lys Tyr Glu Gly Glu Cys
275 280 285

His Ala Glu Ile Met Glu Gln His Gln Ile Leu Lys Ser Cys Ile Cys
290 295 300

Thr Lys Met Tyr Lys Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly His Thr Tyr Pro
305 310 315 320

Asn Leu Cys Val Leu Lys Cys Arg Ile Ser Ser Lys Pro Gly Leu Lys
325 330 335

Leu Ala His Val Gly Lys Cys Gly Ile Gly Leu Leu Ala Val Glu Thr
340 345 350

Lys Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val
355 360 365

[0002] Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn Pro Cys Met Leu Asn Cys
370 375 380

Ala Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys Leu Val His Lys Gly Arg
385 390 395 400

Cys Gln Arg Ser Asp Val Glu Gln Phe
405

<210> 2
<211> 48
<212> PRT
<213> *Triatoma infestans*

<400> 2

Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys
1 5 10 15

Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn Pro Cys Met Leu Asn Cys Ala
20 25 30

Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys Leu Val His Glu Gly Arg Cys
35 40 45

<210> 3
<211> 56
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys
1 5 10 15

Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro
20 25 30

Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile
35 40 45

Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
50 55

<210> 4
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys
20 25 30

Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Ser Gly Pro Cys
50

[0003]

<210> 5
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys
50

<210> 6
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile
35 40 45

Gln Lys Glu Gly Pro Cys
50

<210> 7
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Ile Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0004]

Ala Arg Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg

65	70	75	80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu			
	85	90	95

Arg Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Lys Tyr Ile Met Gln
1 5

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0005]

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Heavy chain CDR2 showing variations:

<220>
 <221> variant
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa is selected from Arg, Asn, and Asp

<220>
 <221> variant
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is selected from Pro, Val, Ile and Met

<220>
 <221> variant
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is selected from Ser, Pro and Ala

<220>
 <221> variant
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa is selected from Gly, Leu, Val and Thr

<220>
 <221> variant
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa is selected from Gly, Tyr, Gln, Lys, Arg, Asn and Met

<220>
 <221> variant
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is selected from Thr, Gly and Ser

<400> 11

Gly Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Ala Leu Asp Val
20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR3 showing variations

<220>

<221> variant

[0006]

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is selected from Ala, Met and Val

<220>

<221> variant

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is selected from Ser and Lys

<220>

<221> variant

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is selected from Pro, Lys, Thr and His

<220>

<221> variant

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is selected from His, Asn, Gly and Gln

<400> 13

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Ala Leu Asp Val
20

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 15

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu Arg Gly Val
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> variant
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is selected from Ala and Ser

[0007]

<220>
<221> variant
<222> (4)..(6)
<223> Xaa can be any amino acid

<220>
<221> variant
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is selected from Leu and Val

<220>
<221> variant
<222> (9)..(10)
<223> Xaa can be any amino acid

<400> 17

Ala Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Gly Ser Ser Glu Met Thr Val His His Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

[0008]

Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	20	25	30	
Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	35	40	45	
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	50	55	60	
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	65	70	75	80
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	85	90	95	
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	100	105	110	
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	115	120	125	
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	130	135	140	
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	145	150	155	160
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	165	170	175	
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	180	185	190	
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	195	200	205	
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	210	215	220	
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	225	230	235	240
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	245	250	255	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	260	265	270	
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	275	280	285	
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	290	295	300	
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	305	310	315	320

	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	
					325					330						335	
	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	
					340				345						350		
	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	
					355				360					365			
	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	
					370			375						380			
	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu	
					385			390				395				400	
	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	
					405					410						415	
	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	
					420				425						430		
	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	
					435				440					445			
[0009]	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	
					450				455					460			
	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	
					465			470				475				480	
	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	
					485					490					495		
	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	
					500				505						510		
	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	
					515				520					525			
	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	
					530			535						540			
	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	
					545			550				555				560	
	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	
					565					570						575	
	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu								
					580				585								

MRYLLLLGLA AFSAVSAEKK DPPCVCPLIW KPVCSDGQT YPSECILNCV KYALKKDIKV
 AYQGICKHVT FAAAAEQEVE GWKGPCECPR ALHRVCGSDG NTYSNPCTLN CAKHERKSDL
 VQVHEGPCSP DEHEFEDPCE CDNKFDVCG TGEVTYRNLC HLECATFTTS PGVEVDYEGE
 CLAEVLLLE NHCACPRVLH RVCSDGNTY SNPCTLDCAK HEGKPDVQV HEGPCDPNDH
 DFEDPCECDN KFEPVCGTDH ITYSNLCHLE CAAFTTSPGV EVKYEGECHA EIMEQHQLK
 SCICTKMYKP VCGTDGHTYP NLCVLKCRIS SKPGLKLAHV GKCGIGLLAV ETKEVRNPCA
 CFRNYVPVCG SDGKTYGNPC MLNCAAQTKV PGLKLVHKGR CQRSDVEQF

SEQ ID NO: 1

图1

I4 EVRNPCL-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLV-HEGRC
 SP: DSLGREAK--CYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQKSGPC
 * | * * | * * * * | * * * * | * * | * *
 K1: DSLGREVRNPCL-----ACFRNYVPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQKSGPC
 * * * * * * * * * * * * | * * * * | * * | * *
 K2: DSLGREVRNPCL-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECML-CAENRKRQTSILIQKEGPC
 * * * * * * * * * * * * | * * * * | * * | * *
 K3: DSLGREVRNPCL-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECMLNCAENRKRQTSILIQKEGPC
 * * * * * * * * * * * * | * * * * | * * | * *

图2

DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQOCPFEDHV KLVNEVTEFA
 KTCVADESAE NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE
 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDN EETFLKKYLY EIARRHPYFY
 APELLFFAKR YKAAFTTECCQ AADKAACLLP KLDELRLDEGK ASSAKQRLKC
 ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPAEFAE VSKLVTDLTK VHTECCHGDL
 LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA
 DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLRLA
 KTYETTLKCY CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFFKQLGE
 YKFQNALLVY YTKKVPQVST PTLVEVSRNL GKVGSCKCKH PEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPK
 EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT KEQLKAVMDD
 FAAFVEKCKK ADDKETCFAE EGKKLVAAASQ AALGL

SEQ ID NO: 19

图3

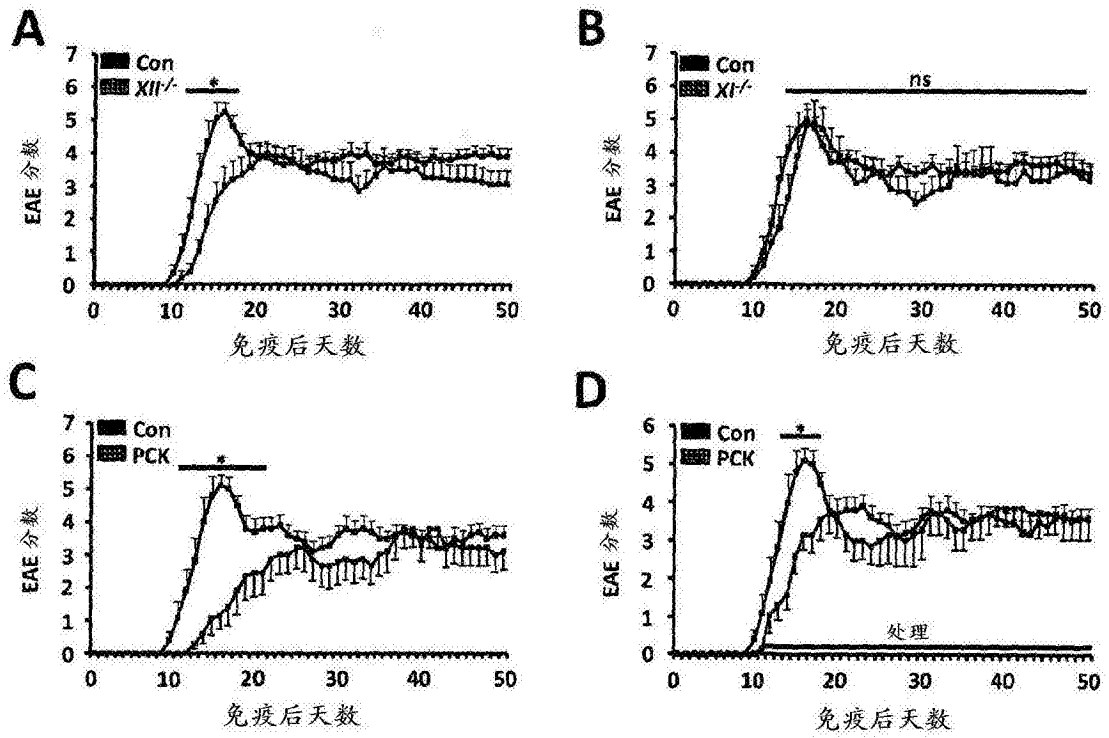
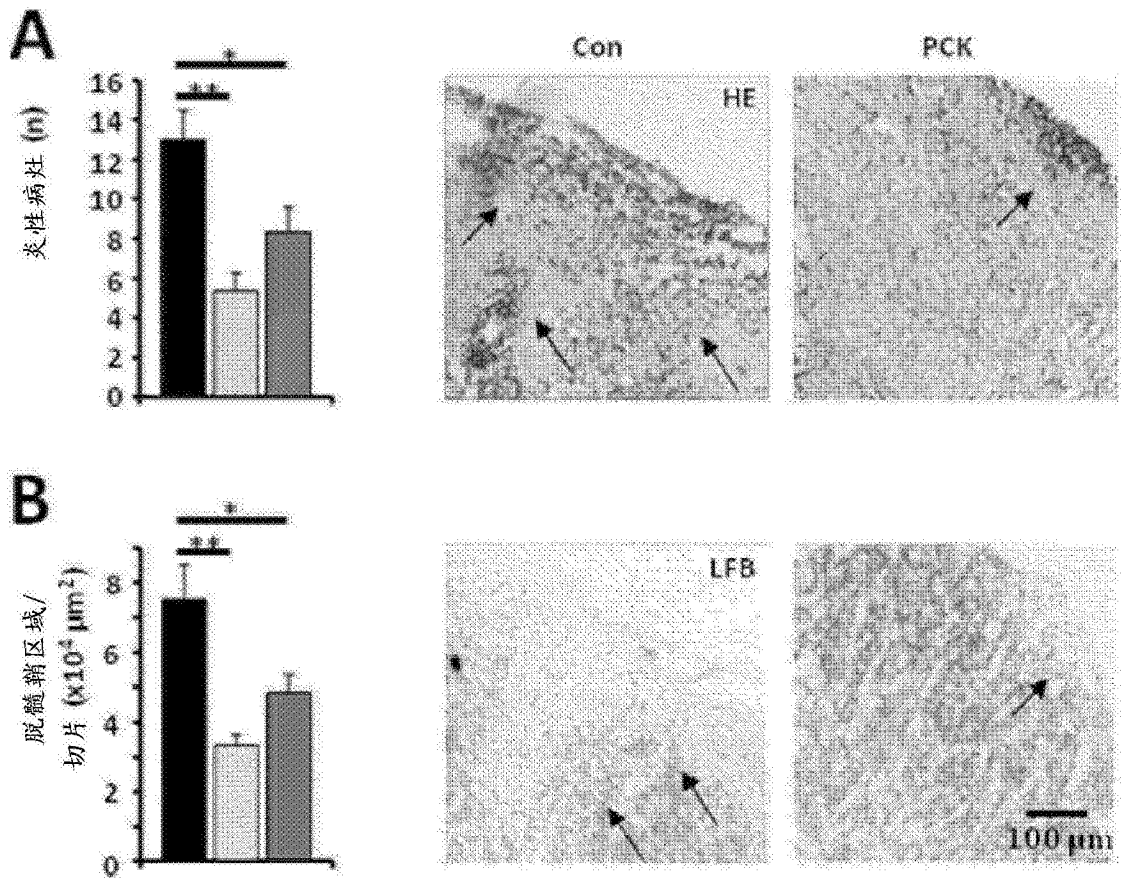


图4



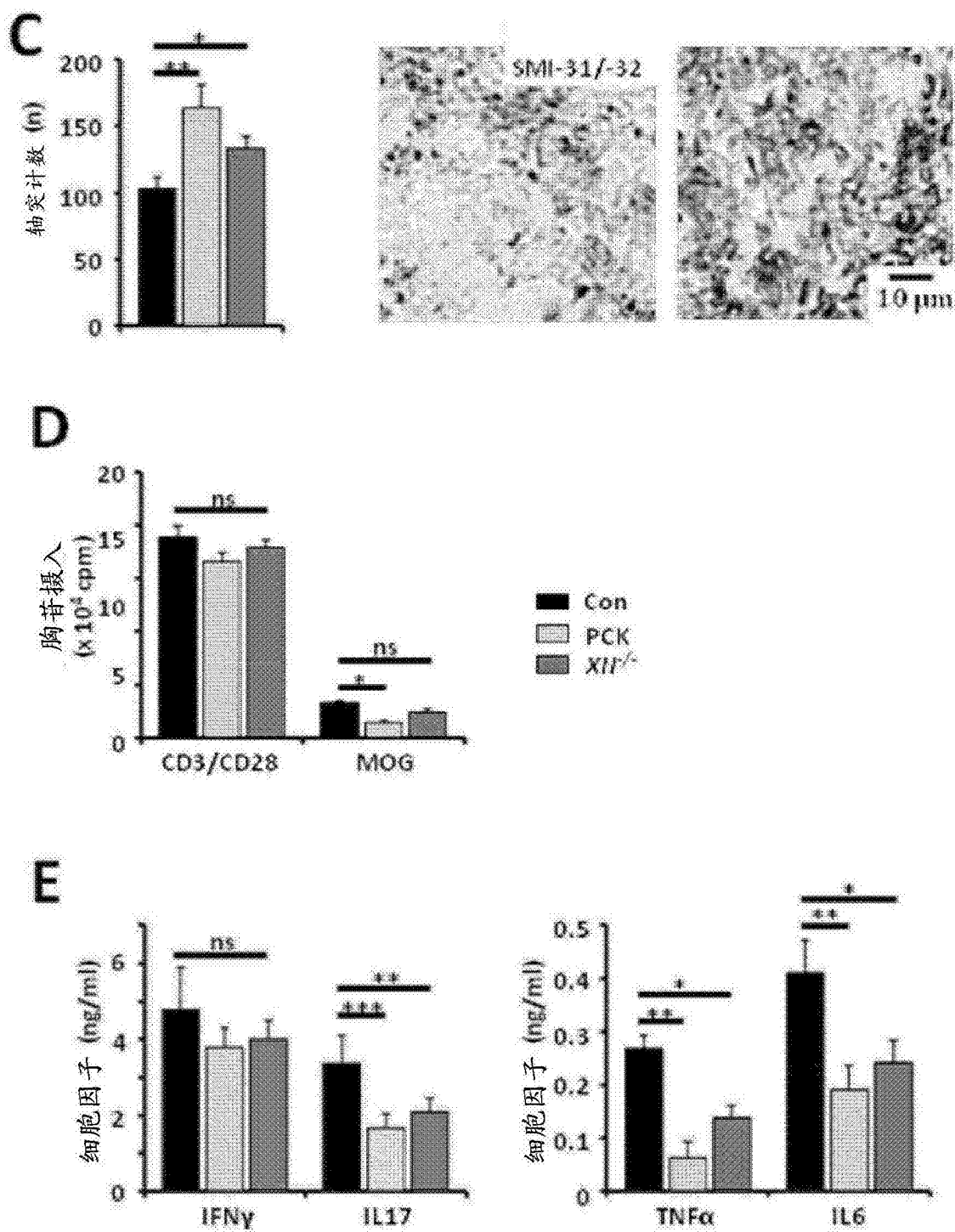


图5

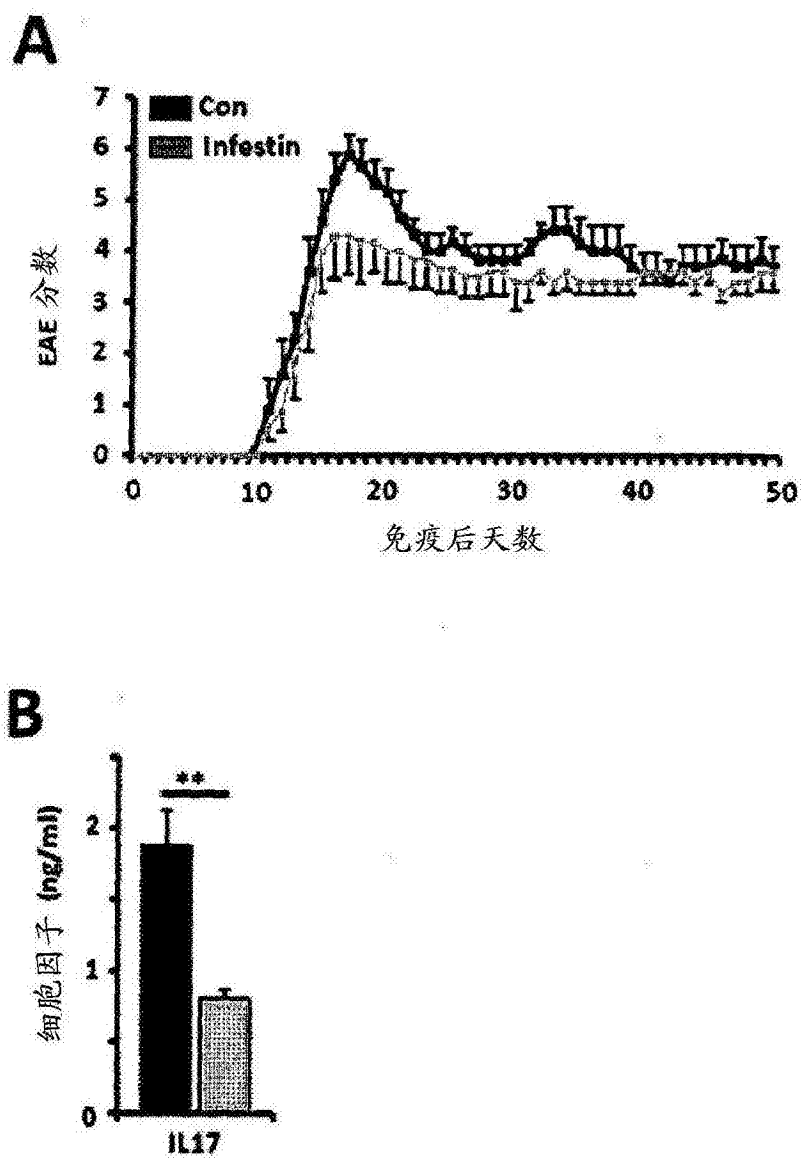


图6

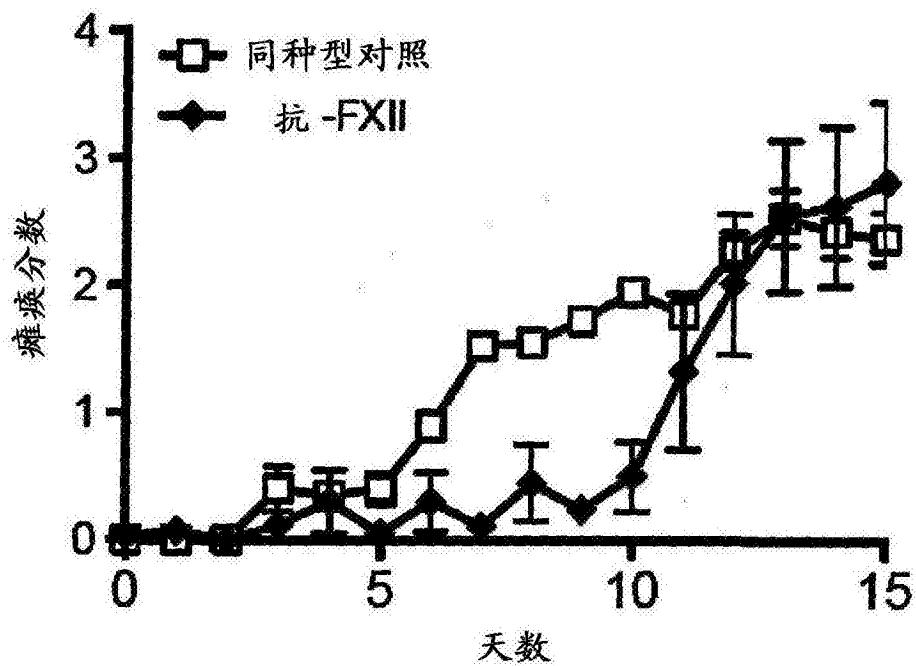


图7

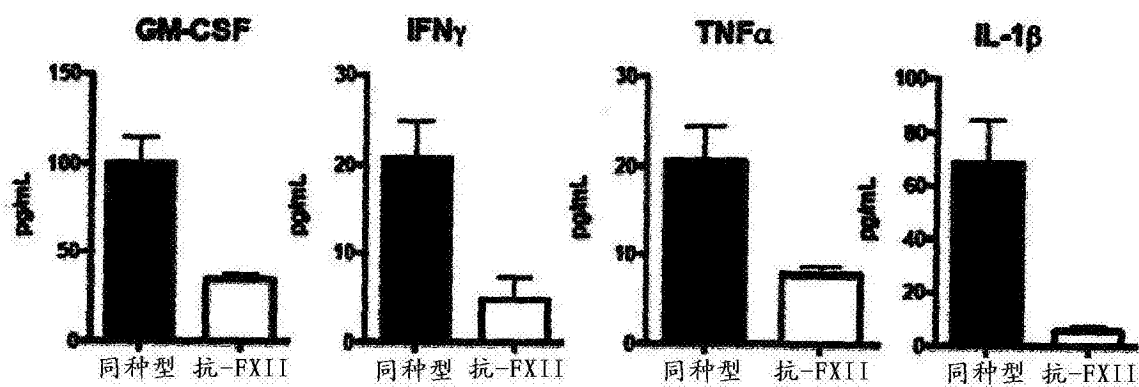


图8