

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 14/745
A61K 38/36 A61P 7/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97195294.9

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 24 日 [11] 授权公告号 CN 1131872C

[22] 申请日 1997. 6. 6 [21] 申请号 97195294. 9
[30] 优先权
[32] 1996. 6. 7 [33] US [31] 08/660,289
[86] 国际申请 PCT/DK97/00251 1997. 6. 6
[87] 国际公布 WO97/47651 英 1997. 12. 18
[85] 进入国家阶段日期 1998. 12. 7
[71] 专利权人 诺沃挪第克公司
地址 丹麦巴格斯瓦尔德
共同专利权人 津莫吉尼蒂克斯
[72] 发明人 L · C · 彼特森 C · E · 哈特
U · 赫德内 M · E · 拉斯穆森
[56] 参考文献
WO9215686A1 1992. 09. 17 A61K38/36
WO9417631A1 1994. 09. 08 A61K38/36
WO9606637A1 1996. 03. 07 A61K38/36

审查员 周 霞
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 樊卫民

权利要求书 1 页 说明书 68 页 附图 11 页

[54] 发明名称 修饰过的因子 VII
[57] 摘要

因子 VII 的催化活性位点经修饰产生一种能有效地阻断血液凝固级联反应的化合物。 这些修饰使因子 VIIa 基本上不能激活血浆因子 X 或 LX。 本发明涉及一种新治疗方法以及修饰过的因子 VII 用于预防和治疗与缺血后再灌注相关的心肌损伤，用于改善再灌注过程中局部心肌血流以及用于维持或改善病人的血管开放度的用途，以及在血管易于形成血栓处修饰过的因子 VII 的局部应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 在其催化中心中至少有一种修饰过的因子 VII 用于制造用来防止或减少与缺血后再灌注相关的心肌损伤的组合物的用途, 其中的修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力, 所述的修饰包括因子 VII 与丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应; 或者, 因子 VII 的修饰包括在 Ser、Asp 和 His 催化三联体中至少一个氨基酸的替换、插入或删除。

2. 如权利要求 1 的用途, 其中的蛋白酶抑制剂是一种有机磷化合物, 一种氯化硫, 一种肽卤甲基酮或一种氮杂肽。

3. 如权利要求 2 的用途, 其中的蛋白酶抑制剂是一种选自 Dansyl - Phe - Pro - Arg 氯甲基酮、Dansyl - Glu - Gly - Arg 氯甲基酮、Dansyl - Phe - Phe - Arg 氯甲基酮和 Phe - Phe - Arg 氯甲基酮中的肽卤甲基酮。

4. 如权利要求 1 的用途, 其中的心肌损伤是心肌坏死。

5. 在其催化中心中至少有一种修饰的因子 VII 用于制造用来改善在缺血后再灌注过程中局部心肌血流的组合物的用途, 其中的修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力, 所述修饰包括因子 VII 与丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应; 或者, 因子 VII 的修饰包括在 Ser、Asp 和 His 催化三联体中至少一个氨基酸的替换、插入或删除。

6. 如权利要求 5 的用途, 其中的蛋白酶抑制剂是一种有机磷化合物, 一种氯化硫, 一种肽卤甲基酮或一种氮杂肽。

7. 如权利要求 6 的用途, 其中的蛋白酶抑制剂是一种选自 Dansyl - Phe - Pro - Arg 氯甲基酮、Dansyl - Glu - Gly - Arg 氯甲基酮、Dansyl - Phe - Phe - Arg 氯甲基酮和 Phe - Phe - Arg 氯甲基酮中的肽卤甲基酮。

修饰过的因子 VII

发明领域

本发明涉及新的治疗方法和修饰形式的因子VII的新用途,修饰过的因子VII抑制血栓形成,维持或改善血管开放度,改善局部心肌血流和调节在缺血后再灌注过程中的心肌损伤。

发明背景

血液凝固是包含一系列不同血液成分或因子的复杂反应,最终产生血纤蛋白块。一般,血液中参与称为凝血级联反应的成分是酶原,一种能通过一种激活物(自身为活化的凝血因子)作用转变成蛋白水解酶的酶学无活性的蛋白质。已经历这种转变的凝血因子一般称为“活性因子”,并添加一个小写“a”命名(如,因子VII a)。

需要活化的因子X (“X a”)以转变凝血酶原为凝血酶,其再将纤维蛋白原转变成纤维蛋白,作为形成纤维蛋白块的最后阶段。有两个系统或途径促进因子X的激活。“内源性途径”指通过利用仅在血浆中存在的因子导致凝血酶形成的那些反应。一系列蛋白酶介导的反应最终产生了因子IX a,其与因子VIII a联合,切割因子X形成X a。在血液凝固的“外源性途径”中,同样的蛋白水解由因子VII a及其辅因子(组织因子)进行。组织因子是一种膜结合蛋白,一般不在血浆中循环。然而,一旦血管破裂,其可在 Ca^{2+} 和磷脂存在下与因子VII a复合以催化因子X或因子IX的激活(Nemerson 和 Gentry, 生物化学(Biochem.) 25:4020 - 4033(1986))。虽然在止血中两种凝血途径的相对重要性不清楚,近年来,已发现因子VII和组织因子在调节血液凝固中起关键作用。

因子VII是以单链酶原形式在血浆中循环的痕量血浆糖蛋白。此酶原无催化活性(Williams 等人,生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 264:7536 - 7543(1989); Rao 等人,美国国家科学院学报

(*Proc. Natl. Acad. Sci.*), 85:6687 - 6691(1988))。单链因子 VII 可以在体外通过因子 X a , 因子 XII a , 因子 IX a 或凝血酶转变成双链因子 VII a 。认为因子 X a 是因子 VII 的主要生理激活剂。象其它几种参与止血的血浆蛋白一样, 因子 VII 的活性依赖维生素 K , 这是在蛋白质氨基端成簇的多谷氨酸残基的 g - 羧基化所需的。这些 g - 羧基化的谷氨酸为因子 VII 与磷脂的金属关联的相互作用所需。

酶原因子 VII 到活化的双链分子的转变通过位于大约分子中部的内肽键的切割来完成。人因子 VII 中, 活性切割位点在 Arg₁₅₂ - Ile₁₅₃ (Hagen 等人, 美国国家科学院院报, 83:2412 - 2416(1986); Thim 等人, 生物化学 (*Biochem.*) 27:7785 - 7793(1988), 此处引用两篇文献作为参考)。牛因子 VII 通过在类似的 Arg₁₅₂ - Ile₁₅₃ 键的切割被激活 (Takeya 等人, 生物化学杂志 (*J. Biol. chem.*) 263:14868 - 14877, 1988)。在组织因子、磷脂和钙离子存在下, 双链因子 VII a 通过有限蛋白水解迅速激活因子 X 或因子 IX。

经常需要选择性阻断病人的凝血级联反应。例如, 可以在肾透析或治疗深静脉栓塞、弥散性血管内凝血 (DIC) 以及其它医学疾病过程中使用如肝素、香豆素、香豆素衍生物、二氢化茚二酮衍生物等的抗凝药。例如, 肝素处理或柠檬酸离子的体外处理 (美国专利 4,500,309) 可用于透析以防止在治疗过程中的凝血。肝素也用于防止手术中病人的深静脉血栓形成。

然而, 用肝素和其它抗凝药的治疗有不期望的副作用。可得的抗凝药一般地作用遍及全身, 而不是特异性作用于凝血位置。例如, 肝素可引起严重出血。此外, 由于半衰期约 80 分钟, 肝素被从血中迅速清除, 需要频繁给药。因为肝素以抗凝血酶 III(ATIII)的辅助因子起作用, 而在 DIC 治疗中 ATIII 被迅速地耗贫, 维持肝素的合适剂量经常是困难的, 需要连续监视 ATIII 和肝素水平。如果 ATIII 极度贫乏肝素也无作用。此外, 肝素的长期使用也可以增加血小板凝集且减少血小板数量, 且参与骨质疏松的形成。二氢化茚二酮衍生物也可有毒副作用。

除了上述简单描述的抗凝药之外, 已发现几种天然存在的蛋白质有抗

凝药活性。例如, Reutelingsperger(美国专利 No.4,736,018)从牛主动脉和人脐静动脉中分离了抗凝蛋白质。Maki 等人(美国专利 No.4,732,891)公开了人胎盘衍生的抗凝蛋白质。此外, ATIII 已被提议用作治疗性抗凝药(Schipper 等人, 柳叶刀(Lancet) 1 (8069): 854 - 856(1978); Jordan, 美国专利 No. 4,386,025; Bock 等人, 美国专利 No.4,517,294)。

血管壁中平滑肌细胞(SMC)的增殖是动脉粥样硬化中血管再造或应答其它血管损伤之后血管损伤形成中的重要事件。例如, 动脉粥样硬化的治疗经常包括: 用血管成形术、动脉内膜切除术或减少动脉粥样硬化斑切除术疏通封闭的血管, 或者用旁路移植, 一些通过导管插入术(血管成形术)将动脉粥样硬化斑压缩或除去, 通过切开(动脉内膜切除术)从动脉壁剥离或通过天然或合成移植物分流的手术方法疏通封闭的血管。这些方法清除了血管内皮, 干扰下面的内膜层, 导致中层平滑肌细胞的死亡。此损伤之后的中层平滑肌细胞增生且移入内膜, 这典型地在损伤后的头几周内最多六个月内发生, 且当覆盖在上面的内皮层重建后停止。在人中, 这些损伤由约 20%细胞和 80%胞外基质组成。

在约 30%或更多的用血管成形术、动脉内膜切除术或旁路移植治疗的病人中, 血栓和/或内膜中平滑肌细胞增生引起血管再闭塞且经常使重建手术失败。这种手术后血管的关闭称为“再狭窄”。

目前仍需要具有抗凝活性改善的物质, 其能以相对低的剂量给药且不产生与传统抗凝剂相关的不期望的副作用。本发明通过提供特异性作用于损伤位置的抗凝药且进一步提供了其他相关的便利来满足这一需要。修饰过的因子 VII 分子给人施用治疗包括血管内凝血的各种情况特别有用。例如, 虽然深静脉血栓和肺栓塞可以用传统抗凝药治疗, 此处所述的修饰过的因子 VII 可用于在确定的如那些经历手术或有充血性心力衰竭的高危病人中防止血栓栓塞并发症。此外, 修饰过的因子 VII 可作为组织因子介导的凝血诱导的拮抗剂, 阻止凝血酶的产生和随后的纤维蛋白沉淀。同样, 修饰过的因子 VII 可用于抑制组织因子活性, 导致如对血液凝固、血栓形成或血小板沉积的抑制。

修饰过的因子 VII 分子特别可用于由于急性血管损伤的内膜增生或

再狭窄的治疗。急性血管损伤是那些与慢性血管损伤(如动脉粥样硬化)相反的迅速发生的(即: 数天至数月的)损伤。急性血管损伤常常由手术过程造成, 如血管重建, 其中使用了血管成形术, 动脉内膜切除术, 动脉粥样硬化斑切除术, 血管移植物置入等技术。增生也可以作为对如: 移植物置入或器官移植的延迟反应而发生。由于修饰过的因子 VII 比肝素更有选择性, 一般地仅结合暴露于损伤位置的组织因子, 且因为修饰过的因子 VII 不破坏其它凝血蛋白, 因此当防止深静脉栓塞的预防性使用时比肝素更有效且更不易引起出血并发症。

冠状动脉疾病的最新进展包括机械性介入的使用以清除或取代病理性斑块物从而重建通过冠状动脉的足够的血流。除了各种形式的机械性介入的使用, 包括气囊血管成形术、减少动脉粥样硬化斑切除术、血管斯坦特固定模(Stent)的放置、激光治疗或喷丸, 这些技术的有效性仍受到治疗后六个月内约 40% 的再狭窄率的局限。

再狭窄被认为是由生物过程的复杂相互作用造成的, 包括: 血小板沉积和血栓形成, 趋化因子和促分裂因子的释放以及血管平滑肌细胞迁移和增生进入扩张的动脉部分的内膜。

对机械性损伤位置的血小板积累的抑制可限制人的再狭窄速率。血小板 Gp II b/III a 的单克隆抗体的治疗性使用可限制人的再狭窄水平(Califf 等人, 新英格兰医学杂志 (N.Engl. J. Med.), 330 : 956 - 961(1994)。该抗体可结合到血小板表面的 Gp II b/III a 受体上因而抑制了血小板积累。此数据提示人冠状动脉中机械性损伤的位置血小板积累的抑制对发生最终治愈反应有利。当在急性血管损伤位置发生血小板积累时, 这些位置的凝血酶的产生可能负责血小板的激活和其随后的累积。

如后面的实施例所示, 本发明修饰过的因子 VII 能与细胞表面的组织因子结合。例如, DEGR - 因子 VII a 以与野生型因子 VII a 相同或更高的亲和力与细胞表面组织因子结合。然而, DEGR - 因子 VIIa 无酶活性, 但其与组织因子结合且用作野生型因子 VIIa 的竞争性拮抗剂, 从而抑制外源性凝血途径导致凝血酶产生的后续步骤。

修饰过的因子 VII 分子保持组织因子结合能力, 其通过阻断凝血酶产

生以及后续纤维蛋白沉积来抑制血管损伤位置的血小板积累。

由于 DEGR - 因子 VII 阻断凝血酶产生以及限制在急性血管损伤处血小板沉积的能力, 保持组织因子结合活性但无因子 VIIa 酶活性的修饰过的因子 VII 分子可用于抑制血管再狭窄。

含有修饰过的因子 VII 的组合物当配制成药物组合物时在用于治疗病人的方法中特别有用, 其中向处于不同疾病状态的个体施用这些修饰过的因子 VII 的组合物以治疗与凝血相关的病状。这种修饰过的因子 VII 分子能与组织因子结合但在凝血级联反应中只有很低的催化其它因子活化的能力, 其具有较长的血浆半衰期, 因而与其它抗凝药相比有相应的较长期的抗凝血活性。适于此组合物的医学适应症是那些通常用抗凝药治疗的如: 深静脉血栓, 肺栓塞, 中风, 弥散性血管内凝血(DIC), 与革兰氏阴性内毒血症相关的肺和肾中纤维蛋白沉积和心肌梗死。这些组合物可用于抑制机械性血管损伤之后发生的血管再狭窄, 如由气囊血管成形术, 动脉内膜切除术, 减少的动脉粥样硬化斑切除术, 斯坦特固定模放置, 激光治疗或 rotablation 造成的损伤, 或在血管移植, 斯坦特固定模, 旁路移植或器官移植之后发生的损伤。这些组合物可因而用于抑制血小板沉积和相关的疾病。因此, 一种抑制凝血、血管再狭窄或血小板沉积的方法, 例如, 包括以足有效抑制凝血、血管再狭窄或血小板沉积的量给病人施用含有修饰过的因子 VII, 如在其催化三联体 Ser₃₄₄、 Asp₂₄₂ 和 His₁₉₃ 中至少有一种氨基酸替换的组合物。该方法也可用于治疗个体中急性冠状动脉闭合(如急性心肌梗塞), 其包括与组织型纤维蛋白溶酶原激活剂或链激酶联合使用修饰过的因子 VII(包括 DEGR - 因子 VII 和 FFR - 因子 VII), 可加速 tPA 诱导的血栓溶解。修饰过的因子 VII 可在血栓溶解剂如组织型纤维蛋白溶酶原激活剂施用之前、同时, 或紧随其后使用。

国际申请 No. WO92/15686 涉及修饰过的因子 VIIa、多核酸和用于修饰过的因子 VIIa 生产的哺乳动物细胞系, 以及用于抑制血液凝固的含有修饰过的因子 VII a 的组合物。

国际申请 No. WO94/27631 涉及用于抑制血管再狭窄、组织因子活性和血小板沉积的方法。

国际申请 No. WO96/12800 涉及一种用于治疗急性冠状动脉闭合的方法, 包括给病人施用与组织型纤溶酶原激活剂或链激酶联合使用的含有修饰过的因子 VII a 的组合物。

发明概述

本发明涉及一种用于抑制病人血栓形成的方法, 其包括在病人易于形成血栓的血管位置局部施用治疗有效剂量的组合物, 此组合物含有在其催化中心至少有一种修饰的因子 VII, 此修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力。血栓形成的位置可与手术, 显微手术、血管成形术或创伤有关。

本发明也涉及一种用于维持或改善病人中血管开放度的方法, 其包括在易于减小开放度的血管位置局部施用治疗有效剂量的组合物, 此组合物含有在其催化中心至少有一种修饰的因子 VII, 此修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力。血栓形成的位置可与手术、显微手术、血管成形术或创伤有关。

本发明还涉及一种预防或减少个体与缺血后再灌注相关的心肌损伤的方法, 其包括给个体施用一种组合物, 此组合物含有在其催化中心至少有一种修饰的药学可接受的因子 VII, 此修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力。

本发明还涉及一种改善个体在缺血后再灌注过程中局部心肌血流的方法, 其包括给个体施用一种组合物, 此组合物包含在其催化中心至少有一种修饰的药学可接受的因子 VII 此修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力。

在一优选的实施方案中, 修饰过的因子 VII 包含因子 VII 与丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应。在一更优选的方面, 此蛋白酶抑制剂是一种有机磷化合物, 一种氟化硫(Sulfanyl fluoride), 一种肽卤甲基酮或一种氮杂肽。在一更为优选的方面, 此蛋白酶抑制剂是一种选自 Dansyl - Phe - Pro - Arg 氯甲基酮, Dansyl - Glu - Gly - Arg 氯甲基酮, Dansyl - Phe - Phe - Arg 氯甲基酮及 Phe - Phe - Arg 氯甲基酮中的肽卤甲基酮,

最优选的为 Phe - Phe - Arg 氯甲基酮。

本发明还涉及在其催化中心至少有一种修饰的因子 VII 用于制造用来防止或减少与缺血后再灌注相关的心肌损伤的组合物的用途, 此修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力。本发明还涉及在其催化中心至少有一种修饰的因子 VII 用于制造用来改善缺血后再灌注过程中局部心肌血流的组合物的用途, 此修饰基本上抑制了修饰过的因子 VII 激活血浆因子 X 或 IX 的能力。

本发明提供了抑制与缺血后再灌注相关的有害事件的方法和组合物。组织、器官或肢体的严重缺血可以由于血流减少也可以与创伤、手术操作或低血压相关。与严重缺血相关的一种并发症是在动脉系统中组织因子的上调。认为这种组织因子表达的增加刺激了促凝血反应(主要在毛细血管床), 因而引发和/或维持了血管内的血栓形成。此外, 通过冠状血管系统内的内皮细胞在缺血后心脏的再灌注过程中组织因子(TF)的从头合成可以导致再灌注过程中冠状动脉血流的减少, 因而影响最终经历坏死的缺血性心肌层的结局。与患稳定性心绞痛的病人相比, 获自患不稳定性心绞痛病人的动脉粥样硬化斑切除术标本中的组织因子抗原及促凝血活性升高。因此, 认为在这些病人中不稳定心绞痛可能有大心外膜冠状动脉的亚内皮组织中组织因子暴露造成斑块破坏这一因素的参与。这将最终促进冠状动脉内血栓形成, 引起冠状动脉血流确实减少。

组织因子也可以一种不同的途径影响冠状动脉血流。在缺血性组织再灌注后, 可以产生闭塞性的或非闭塞性的血栓。动脉床中血栓的产生及在血栓周围血小板的沉积导致该组织中继发性缺血的产生。血栓的产生及血小板的存在于是可引起多种生物活性因子的产生和释放, 包括那些从凝血途径产生的如: 凝血酶和因子 X 以及从活化的血小板中释放的各种因子。这些因子又可引起由底部的内皮和平滑肌细胞或由相邻的单核细胞产生额外的因子, 如 $\text{TNF} - \alpha$ 和 $\text{IL} - 1$ 。这些因子又可再激活内皮细胞导致与单核细胞和中性粒细胞结合相关的各种粘附分子的上调。一般地, 与循环血接触的内皮细胞不表达明显的组织因子活性。在特定条件下, 内皮细胞可通过表达组织因子样促凝血活性有效地促进凝血。特别是, 外源和内

源性产生的氧自由基(OFR)可刺激冠状血管内的内皮细胞合成和表达大量的组织因子。氧自由基是高活性的分子,可进攻各种细胞成分。在缺血期后血流恢复之后有大量氧自由基产生,这些氧化剂可在脂过氧化和细胞成分的其它不可逆改变之后造成一种特殊形式的再灌注介导的组织损伤。氧自由基也可急剧减低组织因子途径抑制剂(TFPI)(一种由内皮细胞合成的抑制外源性凝血途径的 kunitz 型蛋白质)的活性,这种氧自由基的双重效果(由内皮细胞表达组织因子和降低 TFPI 活性)可以将正常内皮天然的抗凝血性质转变成一种促凝血状态,因而有利于一种不希望的血管内凝血的活化。因此,在冠状循环中氧自由基介导的组织因子表达导致在缺血后再灌注过程中冠状动脉血流的明显减少。这种氧自由基介导的组织因子的表达及其带来的外源性凝血途径的活化有严重后果,因为此现象影响缺血后再灌注的病理生理,特别是在经历冠状动脉血栓的急性心肌梗死病人中。

不复流现象,即在先前缺血组织中缺乏对微血管系统一致的灌注,已由 Krug 等人首次描述(Circ. Res. 1966; 19:57 - 62)。可以影响缺血性心肌命运的最重要的决定因素被认为是缺血过程中的侧流量、危险面积的大小以及心肌的氧需求。

在过去的十年中有大量的兴趣集中在用再灌注方案治疗急性的心肌梗死病人方面,包括冠状动脉血栓溶解,初级血管成形术或两者都有。然而,并非全部研究都证实在梗死相关的动脉复通后左心室功能的改善。目前,有相当数目的病人在梗死相关的冠状动脉床中表现出“低流量”状况。此状况至少在死亡率方面几乎完全无益。这种低流量状况被认为至少部分地是由血液缺乏再进入所有的先前缺血性心肌的血管系统的能力引起。现已令人惊讶的表明因子 VIIai 影响且增加在再灌注过程中局部的心肌血流。也已令人惊讶的表明因子 VIIai 导致不复流区域的明显减少。

单核和中性粒细胞的结合和转移以及这些细胞释放的生物活性物质(包括氧自由基的产生)可以加剧内皮细胞活化的水平及破坏程度。最终,如果这种级联反应不经抑制,就可导致全身性并发症和可能刺激多种器官衰竭。通过施用针对组织因子/因子 VII 结合(如: FFR - FVIIa)

的特异性抑制剂封闭组织因子，从而阻断凝血外源性途径的起始，防止级联反应的起始，从而调节与缺血/再灌注相关事件的破坏程度，如，消除或减少心肌的损伤或坏死。

附图说明

图 1. 表示一种 Ser₃₄₄® Ala 修饰过的因子 VII DNA 序列的表达载体的构建。所用符号包括 0 - 1, 0 - 1 图谱单元序列来自腺病毒 5；E，是 SV40 的增强子；MLP，腺病毒 2 主要晚期启动子；SS，一套剪切位点；及 pA，在晚期方向中来自 SV40 的聚腺苷酸化作用信号。

图 2. 表示与盐水处理的对照相比在动脉内膜切除的狒狒主动脉上大剂量注射 DEGR - 因子 VIIa 对血栓形成(血小板沉积)的影响。对动脉测量了 60 分钟以上。DEGR - 因子 VIIa 明显地抑制了在此急性血管损伤的灵长类模型中的富含血小板的血栓的发展。

图 3. 表示当在恒定量的 FVIIa(5nM)存在下用递增浓度的 FVIIa(空心框)或是 DEGR - 因子 VIIa(实心框)培养狒狒平滑肌细胞时所获结果。FX 活化的水平随后用产色底物 S - 2222 测定。数据以在 5nm FVIIa 单独存在时产生的活性的百分比用酰胺水解活性给出。

图 4. 显示与对照动物相比，在颈动脉动脉内膜切除术之后且用 DEGR - 因子 VIIa 处理 7 或 30 天的狒狒的内膜面积尺寸。

图 5. 显示在气囊损伤之后且用 DEGR - 因子 VIIa 处理的狒狒股动脉内膜面积与内膜+中层面积的比率，其中对照组包括 5 只血管，处理 7 天的检测了 11 只血管，处理 30 的检测了 2 只血管(n 是检测的血管数)。

图 6. 显示用于测量梗死尺寸(IS)、不复流(NR)、危险面积(AR)、凝血酶原时间(PT)及活化的部分凝血激酶时间(aPTT)的实验方案。

图 7. 显示三个治疗组中以梗死的危险面积的百分比表示的再灌注期(IS)结束时梗死尺寸图，三个治疗组分别用 FFR - 因子 VIIa，因子 VIIa 和盐水治疗。每条代表 8 只动物的 $\pm$ SD 平均值。

图 8. 显示以梗死的危险面积的百分比表示的再灌注期结束时不复流(NR)的面积图(动物分别用 FFR - 因子 VIIa，因子 VIIa 和盐水治疗)。

每条代表 8 只动物的 $\pm$ SD 平均值。

图 9. 显示对每只动物用多元线性回归方程计算出的预期的不复流(以左心室百分比, LV)与观察到的不复流(以 LV 百分比)之间的关系。

图 10. 显示在缺血 20 分钟、再灌注 10 分钟及 2 小时后用于缺血性心肌评估的局部心肌血流(RMBF)图。

图 11. 显示 FFR - 因子 VIIa 和因子 VIIa 对凝血酶原时间(PT)和活化的部分凝血酶原激酶时间(aPTT)的影响。

具体实施方案的说明

修饰过的因子 VII 可为酶原的形式(即: 一种单链分子)或可在其活性位点被切割。因此, “修饰过的因子 VII”是指包括结合组织因子并抑制因子 IX 到 IXa 和因子 X 到 Xa 活化的修饰过的因子 VII 以及修饰过的因子 VIIa。因子 VII 序列有至少一种氨基酸修饰, 其中所选的修饰可显著减少活化的因子 VII 催化血浆因子 X 或 IX 活化的能力, 因而可抑制凝血活性。修饰过的因子 VII 有经至少一种氨基酸替换修饰的活性位点, 且其修饰过的形式能与组织因子结合。修饰过的因子 VII 组合物典型的是基本上纯的形式。

在优选的人和牛因子 VII 的实施方案中, 活性位点残基 Ser₃₄₄ 被改变, 用 Gly, Met, Thr 或更优选地用 Ala 取代。这种取代可单独进行或与催化三联体中在其它位点(包括 His₁₉₃ 和 Asp₂₄₂)的取代联合进行。

修饰过的因子 VII 组合物适合施用于不同的哺乳动物, 特别是人, 以抑制凝血级联反应。修饰过的因子 VII 可以与其它抗凝化合物联合或代替其它抗凝化合物施于病人。典型地, 用于施于人的药物组合物含有修饰过的人因子 VII 蛋白质以及药学可接受的载体和缓冲剂。

因子 VII 在凝血级联反应中起重要作用, 特别是参与了外源性途径。作为一种单链酶原蛋白质在循环血浆中存在的因子 VII 一旦被活化成为因子 VIIa, 其与组织因子及钙离子一起激活因子 X 成为 Xa, 激活因子 IX 成为 IXa, 最终形成一种纤维蛋白块。

因子 VII 有一个催化位点被修饰以降低因子 VIIa 的催化活性, 同时

此分子保留与组织因子结合的能力。修饰过的因子 VII 分子与天然的因子 VII 和/或因子 VIIa 竞争结合组织因子。结果抑制了因子 X 和 IX 的活化。

修饰过的因子 VII 可以由含有两种可操纵性连接的序列编码区域的一种多核苷酸分子编码, 此两种序列编码区域分别编码一种前原肽和一种维生素 K 依赖型血浆蛋白质的 gla 结构域以及一种无 gla 结构域的因子 VII 蛋白质, 其中一旦表达, 该多核苷酸编码一种不明显激活血浆因子 X 或 IX 且能与组织因子结合的修饰过的因子 VII 分子。由此多核苷酸表达的修饰过的因子 VII 是一种生物活性的抗凝剂, 即它能抑制凝血级联反应, 因而抑制纤维蛋白沉积或凝块的形成。为了表达修饰过的因子 VII, 将此多核苷酸转染入哺乳动物细胞系, 如, BHK, BHK570 或 293 细胞系。

因子 VIIa 的催化活性可以通过催化中心或三联体的化学衍生抑制。通过因子 VII 与一种不可逆抑制剂如一种有机磷化合物, 一种氟化硫 (Sulfonyl fluoride), 一种肽卤甲基酮或一种氮杂肽反应或通过例如酰化作用实现衍生化。优选的肽卤甲基酮包括 PPACK(D - Phe - Pro - Arg 氯甲基酮); (见美国专利 No.4,318,904, 此处引用作为参考), D - Phe - Phe - Arg 和 Phe - Phe - Arg 氯甲基酮(FFR - cmk)以及 DEGR ck(Dansyl - Glu - Gly - Arg 氯甲基酮)。

也可以通过氨基酸替换、插入或删除抑制因子 VIIa 的催化活性。在优选的实施方案中, 在因子 VII 催化三联体的氨基酸序列中(此处限定为含有对因子 VIIa 催化位点有贡献的氨基酸的区域)进行氨基酸替换。一般地在或邻近构成催化位点的氨基酸上进行催化三联体的替换、插入或缺失。在人和牛因子 VII 蛋白中, 构成催化“三联体”的氨基酸是 Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ 和 His₁₉₃(下标编号表明在序列中的位置)。可以用目前可能的技术包括(除了其它之外)蛋白质分离和氨基酸序列测序来测定来自其它哺乳动物种类的因子 VII 中的催化位点。也可以通过与其它丝氨酸蛋白酶, 特别是活性位点已测定的胰凝乳蛋白酶的序列比较从而由该序列的类似活性位点残基测定催化位点(Sigler 等人, 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 35 : 143 - 164, (1968), 此处引用作为参考)。

通过氨基酸替换、插入或删除以防止或是抑制因子 X 和/或 IX 由因子

VIIa 的活化。然而，这种修饰过的因子 VII 也应保持其在凝血级联反应中与真的因子 VII 和/或因子 VIIa 竞争结合组织因子的能力。可以利用如此处所述的一种凝血试验的方法或是利用如人膀胱癌细胞系 J82(Sakai 等人，生物化学杂志(J. Biol. chem.) 264:9980 - 9988(1989)，此处引用作为参考)的含有细胞表面组织因子的一种细胞系的竞争性结合试验的方法方便地测定这种竞争能力。

在人或牛因子 VII 中构成因子 VII 中催化位点的氨基酸，如 Ser₃₄₄，Asp₂₄₂ 和 His₁₉₃ 可以被取代或删除。在本发明中优选仅改变一个氨基酸，从而减少增加此分子抗原性或是抑制其与组织因子结合的可能性，然而，可以进行两个或多个氨基酸改变(取代、添加或删除)，也可以联合进行一种(些)取代、添加和删除。在一优选的关于人和牛因子 VII 的实施方案中，优选地用 Ala 替换 Ser₃₄₄，也可以取代以 Gly, Met, Thr 或其它氨基酸。优选的用 Glu 取代 Asp 以及用 Lys 或 Arg 取代 His。一般地，所选的取代应尽可能少干扰蛋白质三级结构。此处引用作为参考的 Dayhoft 等人的模型(Atlas，蛋白质结构，1978(Atlas of Protein Structure 1978)，Nat'l Biomed. Res. Found.，华盛顿特区)可用作选择其他氨基酸取代的指导。人们可以在人、牛或其它种的合适的催化位点中引入如前述的替代残基，且可以如此处所述测试所得的蛋白质催化活性抑制的水平以及所获的抗凝活性。修饰过的因子 VII 的催化活性将基本被抑制，一般地比相应种类的野生型因子 VII 的催化活性的约 5% 更低，更优选地比其活性的约 1% 更低。

可以利用重组 DNA 技术生产修饰过的因子 VII。一般地，克隆的野生型因子 VII DNA 序列经过修饰以编码期望的蛋白质。再将此修饰过的序列插入一种表达载体，此载体再被转化或转染入宿主细胞。高等真核细胞，特别是培养的哺乳动物细胞是优选的宿主细胞。已知人因子 VII 的完整的核苷酸和氨基酸序列。见美国专利 No.4,784,950，此处引用作为参考，其中描述了重组人因子 VII 的克隆和表达。牛因子 VII 序列由 Takeya 等人在生物化学杂志(J.Biol.Chem.)263 : 14868 - 14872(1988)中描述，此处引用作为参考。

可以通过不同的技术完成氨基酸序列的改变。可通过定点突变进行 DNA 序列的修饰。用来定点突变的技术为本领域周知，且由如 Zoller 和 Smith(DNA 3:479 - 488, 1984)所述。因此，利用因子 VII 的核苷酸和氨基酸序列可以引入所选择的一种(些)改变。

因子 VII 相应的修改包括那些用一种选自维生素 K 依赖型血浆蛋白质因子 IX，因子 X，凝血酶原，蛋白质 C，蛋白质 S 或蛋白质 Z 的 gla 结构域取代其氨基端部分(gla 结构域)的蛋白质。维生素 K 依赖型血浆蛋白质的 gla 结构域的特征为存在 γ - 羧基谷氨酸残基和长度一般从约 30 到约 40 个氨基酸以及在相关基因中带有相应于外显子 - 内含子边界位置的 C 末端。生产带有异源 gla 结构域的因子 VII 的方法公开于美国专利 No.4,784,950，此处引用作为参考。

用于生产修饰过的因子 VII 的 DNA 序列典型地编码一种在因子 VII 蛋白质的氨基端的前肽原以获得正确的翻译后加工(例如：谷氨酸残基的 γ - 羧基化)以及由宿主分泌。前肽原可以是因子 VII 的或是其它如因子 IX，因子 X，凝血酶原，蛋白质 C 或蛋白质 S 的维生素 K 依赖型血浆蛋白质的。如本领域一般技术人员所知晓，在修饰过的因子 VII 中可进行附加的各种修饰，这些修饰不会明显损害此蛋白质作为一种抗凝药的能力。例如，在催化三联体上修饰过的因子 VII 也可在活化切割位点上修饰以抑制此因子 VII 酶原到其活化的双链形式的转变，一般地如美国专利 No.5,288,629 中所述，此处引用作为参考。

用于表达修饰过的因子 VIIa 的表达载体含有能指导一种克隆的基因或 cDNA 转录的启动子。优选的用于培养的哺乳动物细胞中的启动子包括病毒启动子和细胞启动子。病毒启动子包括 SV40 启动子(Subramani 等人，分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol.) 1:854 - 864, 1981)和 CMV 启动子(Boshart 等人，细胞 41 : 521 - 530, 1985)。一种特别优选的病毒启动子是一种来自腺病毒 2 的主要晚期启动子(Koufman 和 Sharp, 分子细胞生物学, 2 : 1304 - 1319, 1982)。细胞启动子包括鼠 κ 基因启动子(Bergman 等人，美国国家科学院院报, 81 : 7041 - 7045, 1983)和鼠 V_H 启动子(Loh 等人，细胞(cell) 33:85 - 93, 1983)。一种特别优选的细胞

启动子是鼠金属硫蛋白 - I 启动子(Palmiter 等人, 科学(Science) 222:809 - 814, 1983)。表达载体也可以含有一套位于启动子下游和因子 VII 序列本身插入位点的上游的 RNA 剪切位点。优选的 RNA 剪切位点可以获自腺病毒和/或免疫球蛋白基因。表达载体中也包含位于插入位点下游的多腺苷酸化信号。特别优选的多腺苷酸化信号包括来自 SV40 的早期或晚期多腺苷酸化信号(Kaufman 和 Sharp, 出处同上), 来自腺病毒 5E1b 区域的多腺苷酸化信号, 人生长激素基因终止子(DeNoto 等人, 核酸研究(Nuc. Acids Res.)9 : 3719 - 3730, 1981)或是来自人因子 VII 或牛因子 VII 基因的多腺苷酸化信号。表达载体也可包括一种位于启动子和 RNA 剪切位点之间的非编码性病毒先导序列, 如腺病毒 2 三联基因先导以及增强子序列, 如 SV40 增强子。

克隆的 DNA 序列通过例如磷酸钙介导的转染法(Wigler 等人, 细胞 14 : 725 - 732, 1978; Corsaro 和 Pearson, 体细胞遗传学(Somatic Cell Genetics)7:603 - 616, 1981; Graham 和 Van der Eb, 病毒学(Virology) 52d:456 - 467, 1973) 或是电穿孔法(Neumann 等人, EMBO. J. 1:841 - 845, 1982) 导入培养的哺乳动物细胞。为了鉴别和挑选表达外源 DNA 的细胞, 一般地将一种能赋予可选择表型(一种选择性标记)的基因与目的基因或 cDNA 一起导入细胞。优选的选择性标志包括对能赋予药物如新霉素、潮霉素和氨甲蝶呤的抗性的基因。选择性标记可以是一种可扩增的选择性标记。一种优选的可扩增的选择性标记是一种二氢叶酸还原酶序列。选择性标记由 Thilly 综述(哺乳动物细胞技术(Mammalian Cell Technology) Butterworth 出版社, Stoneham, MA, 此处引用作为参考)。选择性标记的选择在本领域普通技术人员水平之内。

选择性标记可以与在不同质粒上的目的基因同时转入细胞, 也可以在同一质粒上转入。如果在同一质粒上, 选择性标记和目标基因可以在不同和相同的启动子控制之下, 后一情形产生一种双顺反子(dicistronic)信息。这种类型的构建物为本领域已知(例如, Levinson 和 Simonsen, 美国专利 4,713,339)。在待引入细胞的混合物中添加一个附加 DNA (称作“载体 DNA”)也可能是有益的。

细胞吸收该 DNA 之后，在合适的生长培养基上生长，典型地 1 - 2 天，以开始表达目的基因。此处所用“合适的生长培养基”指一种含有营养物和细胞生长及修饰过的因子 VII 表达所需的其它成份的培养基。培养基一般地包括碳源、氮源、必需氨基酸、必需糖、维生素、盐、磷脂、蛋白质和生长因子。为了产生 γ -羧基化的修饰过的因子 VII，培养基含有优选地从约 0.1mg/ml 到约 5mg/ml 的浓度的维生素 K。再应用药物筛选用于挑选以稳定形式表达选择性标记的细胞的生长。对于已用可扩增的选择性标记转化的细胞，可增加药物浓度以挑选一种高拷贝数的克隆序列，从而增加表达水平。再筛选稳定地转染的细胞克隆中修饰过的因子 VII 的表达。

优选的哺乳动物细胞系包括 COS - 1(ATCC CRL1650)，幼仓鼠肾(BHK)和 293 细胞系(ATCC CRL1573；Graham 等人，普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)36:59 - 72, 1977)。一种优选的 BHK 细胞系是 tk⁻ts13BHK 细胞系(Waechter 和 Baserga, 美国国家科学院院报, 79: 1106 - 1110, 1982, 此处引用作为参考)，此后称为 BHK570 细胞。BHK570 细胞系已保藏在美国典型培养物保藏中心，12301 Parklawn Dr., MD 20852，ATCC 保藏号 CRL 10314。tk⁻ts13 BHK 细胞系也可从 ATCC 获得，其编号为 CRL 1632。此外，可能用到一些其它细胞系，包括大鼠 Hep I(大鼠肝细胞瘤；ATCC CRL 1600)，大鼠 Hep II(大鼠肝细胞瘤；ATCC CRL 1548)，TCMK(ATCC CCL 139)，人肺(ATCC HB8065)，NCTC1469(ATCC CCL9:1)，CHO(ATCC CCL61)及 DUKX 细胞(Urlaub 和 Chasin, 美国国家科学院院报 77:4216 - 4220, 1980)。

也可利用转基因动物技术生产修饰过的因子 VII。优选在宿主雌性哺乳动物的乳腺内生产蛋白质。在乳腺内表达之后将目标蛋白质分泌到奶中克服了许多分离源自其它来源的蛋白质遇到的困难。奶便于收集，可大量获得且已在生化上很好地表征。此外，奶中的主要乳蛋白为高浓度的(典型的从约 1 到 15g/L)。

从商业观点出发，显然优选的用作宿主的种类有大的产奶量。虽然可以使用较小的动物如鼠和大鼠(且是在原理的证明期优选的)，优选使用家

畜类哺乳动物包括，但不局限于猪、山羊、绵羊和牛。由于下列因素：在绵羊中先前的转基因的历史、奶产量、价格及用于收集绵羊奶的方便易得的设备，使绵羊成为特别优选的。关于影响所选的宿主种类的因素的比较参见 WIPO 公开文本 WO88/00239。一般地期望选择一种已培育为乳用的宿主动物的品种，如 East Friesland 绵羊或是在晚些时候通过转基因品系培育以引入乳用牲畜。在任何情况下，应使用已知健康状况良好的动物。

为获得在乳腺中的表达，使用来自乳蛋白质基因的转录启动子。乳蛋白质基因包括那些编码酪蛋白(见美国专利 No.5,304,489，此处引用作为参考)， β -乳球蛋白， α -乳清蛋白及乳清酸性蛋白的基因。优选 β -乳球蛋白(BLG)启动子。对于羊 β -乳球蛋白基因，一般使用该基因序列5'侧翼的至少约406bp区域，虽然优选长达约5kbp的5'侧翼序列的更长部分，如包含5'侧翼启动子和 β -乳球蛋白基因的非编码部分。见 Whitelaw 等人，生物化学杂志(Biochem J.)286:31 - 39(1992)。来自其它种类的启动子 DNA 的相似片段也是合适的。

β -乳球蛋白基因的其它区域也可掺入到构建体中，这可以是待表达基因的基因组区域。本领域一般认同例如，缺乏内含子的构建体与含有这种 DNA 序列的构建体相比表达较差(见 Brinster 等人，美国国家科学院院报 85:836 - 840(1988)；Palmiter 等人，美国国家科学院院报 88:478 - 482(1991)；Whitelaw 等人，转基因研究(Transgenic Res.)1:3 - 13(1991)；WO 89/01343；及 WO 91/02318，此处引入每一文献作为参考)。在这点上，可能情况下一般地优选使用包含编码目标蛋白质的或多肽的基因的全部或部分天然的内含子的基因组序列，因此优选还包括至少一些源自如 β -乳球蛋白的基因的内含子。一种这样的区域是提供用于内含子剪切及从绵羊 β -乳球蛋白基因的3'非编码区的 RNA 多腺苷酸化的一种 DNA 片段。当用于取代一种基因的天然3'非编码序列时，此种绵羊 β -乳球蛋白片段可同时增强和稳定目标蛋白质或多肽的表达水平。在其它实施方案中，用源自一种乳特异性蛋白质基因的相应序列取代修饰过的因子 VII 起始 ATG 周围的区域。这种取代提供了一种推测的组织特异性

起始环境以增加表达。修饰过的因子 VII 的整个前原序列和 5'非编码区序列用例如 BLG 基因的那些取代是方便的，虽然也可以用较小的区域取代。

对于转基因动物中修饰过的因子 VII 的表达，将编码修饰过的因子 VII 的 DNA 片段可操纵地连接到其表达所必需的其他片段上以产生表达单元。这种其他片段包括上述提到的启动子，以及用于提供转录终止和 mRNA 多腺苷酸化的序列。表达单元也包括编码一种可操纵性地连接到编码修饰过的因子 VII 的片段上的分泌性信号序列的 DNA 片段。分泌性信号序列可以是一种天然的因子 VII 分泌性信号序列或可以是另一种蛋白质如乳蛋白的。见如，Von Heinje, 核酸研究, 14:4683 - 4690(1986); 和 Meade 等人, 美国专利 No.4,873,316, 此处引入作为参考。

用于转基因动物的表达单元的构建通过将修饰过的因子 VII 序列插入含有其他 DNA 片段的一种质粒或噬菌体载体中方便地进行，虽然表达单元实质上可以通过任何序列的连接而构建。特别方便的是提供一种含有编码一种乳蛋白的 DNA 片段的载体，用编码修饰过的因子 VII 多肽的序列取代编码此乳蛋白的序列就可构建一种包含此乳蛋白基因表达控制序列的融合基因。在任何情况下，在质粒或其它载体中表达单元的克隆有利于修饰过的因子 VII 序列的扩增。扩增可在细菌宿主细胞中(如 E.coli)方便地进行，因此载体中典型地包括在细菌宿主细胞中有功能的复制起点和选择性标记。

再将表达单元引入所选宿主种类的受精卵(包括早期胚)。可通过几种途径，包括显微注射(如美国专利 No.4,873,191)，逆转录病毒转染(Jaenisch, 科学 240:1468 - 1476(1988))或利用胚胎干细胞(ES)进行定点整合(由 Bradley 等人, Bio/Technology 10:534 - 539(1992)综述)等方式中的一种完成异源 DNA 导入。将卵植入假妊娠的雌性动物的输卵管或子宫中以使之发育足月。在其胚系中携带导入的 DNA 的子代可将此 DNA 以正常孟德尔方式传入其子代，以使转基因种群发展。

用于生产转基因动物的一般程序为本领域已知。见如，Hogan 等

人,鼠胚胎操作:一种实验室手册,冷泉港实验室, 1986(Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986); Simons 等人, Bio/Technology 6:179 - 183(1988); Wall 等人, Biol. Reprod. 32:645 - 651(1985); Buhler 等人, Bio/Technology 8:140 - 143(1990); Ebert 等人, Bio/Technology 9:835 - 838(1991); Krimpenfort 等人, Bio/Technology 9:844 - 847(1991); Wall 等人, 细胞生物化学杂志(J. Cell Biochem.)49 : 113 - 120(1992); 美国专利 No.4,873,191 和 4,873,316; WIPO 公开文本 WO 88/00239, WO90/05188, WO 92/11757 和 GB87/00458, 此处引入这些文献作为参考。用于将异源 DNA 序列引入到哺乳动物和其胚细胞中的技术最初是在鼠中发展的。见如, Gordon 等人, 美国国家科学院院报 77 : 7380 - 7384, (1980); Gordon 和 Ruddle, 科学 214 : 1244 - 1246(1981); Palmiter 和 Brinster, 细胞 41 : 343 - 345(1985); Brinster 等人, 美国国家科学院院报, 82:448 - 4442(1985); 及 Hogan 等人, (出处同上)。这些技术随后被修改以适于用在较大的动物, 包括家畜品种中(见如, WIPO 公开文本 WO88/00239, WO90/05188 和 WO92/11757 和 Simons 等人, Bio/Technology 6 : 179 - 183(1988)。总之, 目前最有效的用于转基因鼠或家畜产生的途径中, 按照已建立的技术将数百个线性目标 DNA 分子注射入一个受精卵的核原(pro - nuclei)中。也可将 DNA 注射入受精卵的细胞质中。

也可以采用在转基因植物中的生产。表达可以是广泛的或定向于特定的器官如块茎。见 Hatt, 自然 344 : 469 - 479(1990); Edelbaum 等人, 干扰素研究杂志(J. Interferon Res.)12 : 449 - 453(1992); Sijmons 等人, Bio/Technology, 8:217 - 221(1990); 及欧洲专利局公开文本 EP255,378。

修饰过的因子 VII 可以通过亲和层析在一种抗因子 VII 抗体柱上纯化。特别优选的是钙离子依赖型单克隆抗体的使用, 如 Wakabayashi 等人, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)261:11097 - 11108(1986)和 Thim 等人, 生物化学(Biochem.)27:7785 - 7793(1988)所述, 此处引入此文献作

为参考。可以通过传统化学纯化手段如高效液相层析进行进一步的纯化。其它纯化方法,包括柠檬酸钡沉淀为本领域已知,可以用于纯化此处所述的新型修饰过的因子 VII(一般地见, Scopes R., 蛋白质纯化(Protein Purification) Springer - Verlag, N.Y., 1982)。基本上纯的修饰过的因子 VII 优选为至少约 90 ~ 95%同质的, 最优选为 98 ~ 99%同质的, 以用于药物用途。一旦纯化, 如所期望的部分同质或达到同质这种修饰过的因子 VII 就可用于治疗。

修饰过的因子 VII 在其活化位点被切割以将其转变为双链形式。活化可以按本领域已知的方式进行, 如由 Osterud 等人, 生物化学(Biochemistry)11 : 2853 ~ 2857(1972); Thomas, 美国专利 No. 4,456,591; Headner 和 Kisiel 临床研究杂志(J. Clin. Invest.)71 : 1836 - 1841(1983); 或 Kisiel 和 Fujikawa, Behring Inst. Mitt., 73 : 29 - 42(1983)所述, 此处引入作为参考。所获分子再如下述配制和施用。

组合物

化合物典型地在实施干预之前 24 小时内及之后多达 7 天内施用。用于防止或减小心肌损伤的给药可通过如此处进一步详述的多种途径。化合物也可以在易于形成血栓的血管位置例如在吻合术位置或在易于减少开放度的血管位置局部施用。

在预防或治疗心肌损伤时, 修饰过的因子 VII 的剂量对于 70kg 病人的作为注入和维持剂量的范围为约 50mg 到 500mg/天, 更典型的 1mg 到 200mg/天, 且更优选的从 10mg 到约 175mg/天, 取决于病人的体重和病况的严重性。

用于治疗心肌损伤的药物组合物用于在预防和/或治疗中的非肠道给药。优选地, 该药物组合物是非肠道性给药, 即静脉、皮下或肌肉内给药。用于非肠道给药的组合物包含溶于一种可接受的载体, 优选地作为一种水性载体中的修饰过的因子 VII 分子的一种溶液。可以使用多种水性载体如水、缓冲液、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等。也可将修饰过的因子 VII 分子制成用于输送和定位于损伤靶点的脂质体制剂中。脂质体制剂一般地如

U.S. 4,837,028, U.S.4,501,728 及 U.S.4,975,282 中所述, 此处引入作为参考。可以用传统的周知的灭菌技术将组合物灭菌。所得的水溶液可以被包装使用或在无菌条件下过滤和冷冻干燥, 冻干制剂可以在施用前与无菌水溶液混合。该组合物可含有近似生理条件所需的药学可接受的辅助物质, 如 pH 调节和缓冲剂、渗透压调节剂等等, 例如, 乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。在这种制剂中修饰过的因子 VII 的浓度可有很大变化, 即: 从低于约 5%, 通常至少在约 1%到最多达 15 或 20%重量百分比, 且主要由液体体积、粘度等以及所选的特定给药方式所决定。

因此, 典型地用于静脉输注的药物组合物可由多达 250ml 的无菌林格溶液(Ringer's Solution)和 10mg 修饰过的因子 VII 制成。制备非肠道给药化合物的具体方法为本领域普通技术人员已知或显而易见的, 且如 Remington 药物科学(Remington Pharmaceutical Science)16 版, Mack 出版公司, Easton, PA(1982)中所详述, 此处引入作为参考。

含有修饰过的因子 VII 分子的组合物可以在预防和/或治疗性处理中给药。在治疗性应用中, 组合物如前述以足以治愈或至少部分阻止该疾病及其并发症的量施用于已患病的病人。足以达到目的量称为“治疗有效剂量”。用于此的有效剂量取决于疾病或损伤的严重性以及病人的体重和一般状况, 对于 70kg 病人而言一般地范围从约 0.05mg 到约 500mg 修饰过的因子 VII/天, 常用的剂量为从约 1.0mg 到约 200mg 修饰过的因子/天。必须注意本发明的材料可以一般地应用于严重的疾病或损伤状态中, 即威胁生命或可能威胁生命的情况。在这种情况下, 由于所含外源物质很少且在人中修饰过的人因子 VII 的免疫原性普遍缺乏, 可能(也可能是治疗医生期望的)施用大大过量的修饰过的因子 VII 组合物。

在预防性应用中, 含有修饰过的因子 VII 的组合物施用于易于受到或处于疾病状况或损伤威胁的病人以增强病人自身的抗凝血能力。这种剂量称为“预防有效剂量”。在此用途中, 精确的量同样取决于病人的健康状况和体重, 对于 70kg 病人一般地范围从约 0.05mg 到约 500mg, 更常见的从约 1.0mg 到约 200mg/70kg 体重。

该组合物的单次或多次施用可以治疗医生所选的剂量水平和方案进

行。对于救护车病人需要日常维持水平，可以用例如便携式泵系统连续注入方式完成修饰过的因子 VII 的施用。

修饰过的因子 VII 的局部运送如，在易于形成血栓的血管位置(如：吻合术处)或在易于减少开放度的血管位置局部应用修饰过的因子 VII 可以通过如喷雾，灌注，双气囊导管，斯坦特固定模，植入血管的移植物或斯坦特固定模，用于包被气囊导管的水凝胶或是其它已建立的方法进行。在任何情况下，药物组合物应提供足以有效治疗病人的量的修饰过的因子 VII。

提供下列实施例用于阐明，而不是限制本发明。

实施例

实施例 1. Ser₃₄₄® Ala₃₄₄ 因子 VII 的表达

为产生 Ser₃₄₄® Ala 因子 VII 活性位点突变体，用 XbaI 和 KpnI 消化质粒 FVII(565+2463)/pDX(美国专利 No.4,784,950，此处引入作为参考；保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 40205)，回收所得的含有丝氨酸 344 编码区域的 0.6kb 片段。此片段如图所示克隆入 XbaI, KpnI 消化的 M13mp19。此操作及随后的步骤一般地如下述按照标准方案进行(如 Maniatis 等人，分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室出版社所述，冷泉港，N.Y.(1982)，此处引入作为参考)。

利用突变的寡核苷酸 ZC 1656 (5'TGG GCC TCC GGC GTC CCC CTT3')及“通用”第二引物 ZC87(5'TCC CAG TCA CGA CGT3')按照 Zoller 和 Smith 的方法在 M13 模板上进行突变。用激酶化的(Kinased) ZC1656 筛选反应产物。挑选阳性克隆，制备模板 DNA 并从在 1077 的 PstI 位点到在 1213 的 KpnI 位点测序。序列分析证实存在期望的突变。突变的克隆称为 1656。

用 1656 克隆构建一种表达载体。以约 0.14kb 的 Pst I - KpnI 片段从 M13 载体上分离突变的序列。此序列与来自 FVII(565+2463)/pDX 的 1.7kb Hind III - XbaI 片段，来自 FVII(565+2463)pDX 的 0.5kb XbaI - PstI 及来自 FVII(565+2463)/pDX 4.3kb KpnI - HindIII 片段连接，

如图所示。通过用 PstI 消化突变体和野生型克隆及用 KpnI 和 XbaI 消化 M13 中插入因子 VII 的突变体，准备所消化 DNA 的 Southern 杂交及用放射性标记的 ZC1656 探查杂交证实期望的突变序列的存在。

以两种分离的(命名为#544和#545)的 1656 表达载体转染幼仓鼠肾细胞系 BHK570(保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 10314)。通过以 1 : 10 比例将铺满 10cm 平皿的 BHK570 细胞稀释入 5 个非选择性培养基的 10cm 平皿中(Dulbecco 改良 Eagle 培养基[DMEM], 含 10%胎牛血清及 1%PSN 抗生素混合物[GIBCO 生命技术, Gaithersburg, MD])。24 小时后，当细胞达到 20 ~ 30%铺满度时，它们将与一种编码 1656 突变的表达载体质粒 p486(含有腺病毒 5 起点，SV40 增强子，腺病毒 2 主要晚期启动子，腺病毒 2 三联体先导，5'和 3'剪切位点，DHFR^r cDNA 和 pML - 1 中的 SV40 多腺苷酸化信号(Lusky 和 Botchan, 自然 293:79 - 81, (1981))以及 10mg 载体 DNA(超声过的鲑精 DNA)共转染，如表 1 所示。DNA 加入 15ml 管中，再加入 0.5ml 2x Hepes (25g Hepes, 40g NaCl, 1.8g KCl, 0.75gNa₂HPO₄ · 2H₂O, 5g 葡萄糖用蒸馏水稀释到 2.5L, pH 调到 pH6.95 - 7.0)，试管中混合。通过以巴斯德吸管向 DNA/Hepes 溶液鼓入空气的同时加入 0.5ml 0.25M CaCl₂ 的方式沉淀每管中的 DNA。振荡这些管，室温下孵育 15 分钟，再次振荡。用吸头将 DNA 混合物滴加到细胞平皿上。旋转平皿且在 37 °C 下培养 4 ~ 6 小时。培养后，向每一平皿中加入 2ml 以 Tris - 盐水(0.375gKCl, 0.71g Na₂HPO₂, 8.1gNaCl, 3.0gTris - HCl, 0.5g 蔗糖, 稀释到 1L, pH 调到 pH7.9)稀释的 20%甘油。旋转平皿，室温下放置 2 分钟。将培养基移出平皿且换成 2ml Tris - 盐水。室温下放置平皿 2 分钟后，移去 Tris - 盐水，用 10ml 非选择性培养基替换。平皿在 37 °C 下培养两天。

表 1 转染*

	544	545	544 对照	545 对照
质粒名称				
克隆 544	15ml	---	15ml	---
克隆 545	---	30ml	---	30ml
p486	1.5ml	1.5ml	---	---
载体 DNA	1.6ml	1.6ml	1.6ml	106ml

* 所用 DNA 浓度为: 克隆 544: 0.7mg/ml; 克隆 545: 0.3mg/ml; p486: 1.49mg/ml.

培养两天后, 细胞稀释于选择性培养基(DMEM, 含 10%透析过的胎牛血清, 1%PSN 抗生素混合物和 150nM 氨甲蝶呤)且以 1 : 100, 1 : 250 和 1 : 500 的稀释度接种于特大平皿中。平皿在 37 °C 下培养一周。一周后, 更换培养基且用选择培养基替换, 检查平皿中群落的形成。

八天后, 菌落形成之后从#544 和#545 转染的 1 : 500 稀释的平皿中随机选择 12 个菌落。每个菌落接种于 6 孔板中的一个孔, 生长于选择性培养基。七天后, 平皿铺满后将每个菌落分入 10cm 平皿的选择性培养基中。

上述克隆及转染以表达野生型因子 VII 的对照细胞用 ^{35}S - 甲硫氨酸 - 半胱氨酸蛋白质标记混合物 (NEN DuPont 生物技术系统, Wilmington, DE) 代谢性标记。菌落生长且制备用于在选择性培养基中脉冲标记实验。用磷酸缓冲盐溶液 (Sigma, St. Louis, MO) 冲洗细胞, 在 $20\text{mCi/ml } ^{35}\text{S} - \text{Cys} - ^{35}\text{S} - \text{Met}$ 中脉冲标记 4 小时。4 小时后, 收集上清液和细胞。细胞裂解基本上如 Lenk 和 Penman 所述(细胞 16 : 289 - 302, 1979))且用 50ml Staph A (Sigma, St. Louis, Mo) 预清除 400ml 每种裂解液。

来自代谢性标记的细胞样本通过首先与 6ml 抗因子 VII 多克隆血清孵育 4 小时放射免疫沉淀(RIP)。每种样品中加入 60 μl 洗过的葡萄球菌

蛋白 A, 4℃下轻摇样品 1.5 小时。离心样品, 除去上清液。沉淀在 0.7M RIPA 缓冲液[10mM Tris, pH7.4, 1%脱氧胆酸[Calbiochem 公司, La Jolla, CA], 1% Triton X - 100, 0.1 % SDS, 5mMEDTA, 0.7M NaCl)中洗两次, 再在 0.15M RIPA 缓冲液中 (10mM Tris, pH7.4, 1%脱氧胆酸 [Calbiochem 公司, La Jolla, CA], 1 % Triton X-100, 0.1%SDS, 5mM EDTA, 0.15M NaCl) 洗一次。每个样品中加入 100 μ l 1xSDS 染料 (50mM Tris - HCl, pH6.8, 100mM 二硫苏糖醇, 2% SDS, 0.1%溴酚蓝, 10%甘油), 样品煮沸 5 分钟, 随后离心以除去蛋白 A。每个样品的 50 μ l 在 10%聚丙烯酰胺凝胶上电泳。结果显示, 10 个菌落中的 9 个分泌修饰过的因子 VII。

实施例 II 修饰过的因子 VII 的抗凝血活性

修饰过的因子 VII 蛋白质抑制凝血的活性在一步凝血实验中测定, 利用野生型因子 VII 作为对照。重组蛋白质基本上按照上述方法从培养于含 5mg/ml 维生素 K 的培养基中的细胞制备。不同量的修饰过的因子 VII(来自克隆 544)或重组野生型因子 VII 用 50mM Tris, pH7.5, 0.1%BSA 稀释到 100ml。此混合物与 100ml 缺乏因子 VII 的血浆(George King 生物学公司, Overland Park, KS)和 200ml 促凝血酶原激酶 C(Dade, Miami, FL; 含有兔脑促凝血酶原激酶和 11.8mM Ca^{++})一起孵育。在一种自动凝血计时仪(MLA Electra 800, 医学实验室自动化公司, Pleasantville, NY)中进行凝血实验, 利用由 1 : 5 到 1 : 640 收集的正常的人血浆稀释液构建的标准曲线(假定含有每毫升 1 个单位因子 VII 活性; 通过从健康供体收集柠檬酸盐血清制得)将凝血时间转变成因子 VII 活性单位。通过此实验, 修饰过的因子 VII 制剂未显示可检测的凝血活性。表 2 显示对照(未转染的)BHK 细胞条件的培养基(+/- 维生素 K)、野生型因子 VII 和两株分离的表达修饰过的因子 VII 细胞的凝血时间的实验结果。通过在凝血时间上比对照样品的减少可见因子 VII 活性。

表 2

样品	稀释度	凝血时间(秒)
对照+K	1:5	33.1
	1:10	33.4
对照 - K	1:5	34.3
	1:10	33.2
野生型因子	1:20	19.0
	1:40	21.5
	1:80	23.3
修饰过的因子 VII(#6)	1:1	33.5
修饰过的因子 VII(#10)	1:1	32.5

为了测定修饰过的因子 VII 对血浆因子底物的作用, 修饰过的因子 VII 制剂以及重组野生型或天然的因子 VII 一起与因子 X 或因子 IX 孵育, 通过凝血实验或聚丙烯酰胺凝胶电泳监测其活性。

实施例 III 修饰过的因子 VII 结合组织因子的能力

修饰过的因子 VII 与野生型因子 VII 竞争性结合组织因子以及抑制其凝血活性的能力在一步凝血实验中在有限量的组织因子(促凝血酶原激酶)存在下测定。

在类似于实施例 II 所述的一步实验中确定凝血时间。在混合实验中使用有限量的组织因子、恒定量的野生型因子 VII 以及增加的变体因子 VII 的量。在含有增加的变体因子 VII 的量的实验中凝血时间的增加显示因子 VII/VIIa 凝血原活性的抑制。

在测试样品中, 因子 VII 的量以在收集正常的血浆中测定的因子 VII 活性的标准曲线的百分比计算。利用在磷酸缓冲盐液(PBS)中范围从 1:5 ~ 1:640 的收集的正常血浆系列稀释液得出因子 VII 活性的标准曲线。为了此目的, 假定正常血浆含约 500ng/ml 因子 VII, 且以此为一个活性单位。100ml 因子 VII 缺乏的血浆, 100ml 血浆稀释液及 200ml 凝血酶 C (Dade, Miami, FL)的混合物用于在 MLA Electra800 自动计时仪

上测量凝血时间。为建立标准曲线，结果以每秒计的凝血时间的活性百分数(1 : 5=100%活性)画图。

实验所要求的培养基含有组成少于 1%血清的野生型及变体因子 VII。用 PBS 制成稀释液以使凝血时间落入标准曲线的范围。典型的最低稀释度为 1 : 2。终体积为 100ml。在实验中测试了命名为克隆“#10”和“#6”的两个不同的人因子 VII Ser₃₄₄® Ala 变体。列于下表的结果显示，随着因子 VII 变体的增加，因子 VIIa 的活性百分比减少。

表 3:

用 Ser₃₄₄→Ala 混合实验的结合

变体 (B4A1 (野生型) 培养基用作在 10 μl/反应的 100%活性)

Ser ₃₄₄ → Ala 克隆 No.	变体在培养基中的量	B4A1 培养基的量	BHK 对照 *	因子 VIIa 活性的百分比
#10	10 μl	10 μl	0	70
#10	20 μl	10 μl	0	51
#10	30 μl	10 μl	0	43
#10	40 μl	10 μl	0	34
#10	50 μl	10 μl	0	28
#10 (-K) [§]	20 μl	10 μl	0	78
#6	10 μl	10 μl	0	74
#6	20 μl	10 μl	0	56
#6	30 μl	10 μl	0	46
#6	40 μl	10 μl	0	41
#6	50 μl	10 μl	0	32
#6	20 μl	10 μl	0	85
BHK 对照	0	10 μl	20 μl	91
BHK 对照 (-K)	0	10 μl	20 μl	107

* 未转染条件的培养基

[§] 除了标明“(-K)”的情况，为表达变体因子 VII，
细胞在有维生素 K 存在下生长

这些实验表明,带有 Ser₃₄₄® Ala 取代的因子 VII 变体以剂量依赖型形式与天然因子 VII 竞争,抑制天然因子 VII/VIIa 的凝血原活性。因此可得出结论: Ser₃₄₄® Ala 变体人因子 VII 与天然人因子 VIIa 竞争,从而抑制人血浆中因子 X 和/或 IX 的活性。

实施例 IV 因子 VII 与 PPACK 的反应

重组因子 VII 在转染的幼仓鼠肾细胞中产生。此蛋白质的纯化和活化如 Thim 等人(生物化学(Biochemistry)27 : 7785 - 7793 , 1988), Brinkous 等人(美国国家科学院院报 86 : 1382 - 1386, 1989)及 Bjoern 和 Thim(Res. Discl. No. 269,564,1986)所公开,此处引入作为参考。细胞培养液回收、过滤并稀释以减低盐浓度。稀释的培养液再利用含有 CaCl₂ 的洗脱缓冲液通过阴离子交换层析分离。回收因子 VII 流份再利用钙离子依赖抗因子 VII 单克隆抗体通过免疫层析进一步纯化。利用分别以 CaCl₂ 和 NaCl 洗脱因子 VII 的两步阴离子交换层析进行进一步纯化。

50mM Tris - HCl, 100mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.4 中的重组因子 VIIa(1mM)与 20mM PPACK(D - 苯丙酰 - 脯氨酰 - 精氨酰氯甲基酮; Calbiochem, La Jolla, CA)孵育 5,20 和 60 分钟。再加入含有产色底物 S2288(H - D - 异亮氨酸 - L - 脯氨酰 - L - 精氨酸 - 对硝基苯胺; Kabi Vitrum AB, Molndal, 瑞典)以获得 2.5 倍稀释液,且终浓度为 0.3mM S2288。测量对硝基苯胺的产生且与利用未处理的因子 VIIa 为对照所获的结果比较。结果表明在这些反应条件下约 60 分钟后因子 VIIa 完全失活。

实施例 V DEGR - 因子 VIIa 的产生

如实施例 IV 所述制备重组人因子 VIIa。10mM 甘氨酸缓冲液, pH8.0, 10mM CaCl₂, 50mM NaCl 中的重组人因子 VIIa 稀释到 1.5mg/ml 的浓度。加入 10 倍摩尔过量的溶于蒸馏水中的 Dansyl - L - Glu - Gly - Arg - 氯甲基酮, DEGRck, (Calbiochem, La Jolla, CA, 92037)到因子 VIIa 中, 37℃ 孵育 2 小时后, 再加入 10 倍摩尔过量的 DEGRck 到混合

物中, 37℃下再孵育2小时。第三次加入10倍摩尔过量的DEGRck到因子VIIa中, 4℃下孵育约16小时。此DEGR-因子VIIa样品在4℃下对Tris缓冲盐水(0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH7.5)充分透析以除去任何游离的DEGRck。

在因子Xa产色底物实验中测定最终DEGR-因子VIIa混合物中游离DEGRck的存在。DEGR-因子VIIa混合物与产色底物S-2222一起加入到纯化的人因子Xa中。此底物特异性地由因子Xa切割, 而不被因子VIIa切割。混合物中未结合的DEGRck能与因子Xa结合, 从而抑制因子Xa的产色活性。将游离DEGRck加入因子Xa的混合物中产生标准曲线, 以通过因子Xa产色活性的抑制测量溶液中游离DEGRck的水平。DEGR-因子VIIa混合物的分析表明游离DEGRck:DEGR-因子VIIa的比率在充分透析后低于0.5%, 从而保证在下述不同鉴定体系中通过DEGR-因子VIIa观察到的抑制不是由于游离DEGRck的存在。

实施例 VI 在大鼠平滑肌细胞上因子Xa的产生

通过利用特异于因子Xa的产色底物测定细胞刺激因子X转变为因子Xa的能力分析平滑肌细胞的细胞表面组织因子的存在。

大鼠血管平滑肌细胞(Clowes 等人, 临床医学研究(J. Clin. Invest.)93 : 644 - 651(1994))以8,000细胞/孔的密度接种于96孔培养皿(美国科学产品, Chicago, IL)的培养基中(表4)。

表 4

500ml Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM);

(GIBCO - BRL, Gaithersburg, MD)

10%胎牛血清(Hyclone, Logan, UT)

1mM 丙酮酸钠(Irvine, Santa Ana, CA)

0.29mg/ml L-谷氨酰胺(Hazelton, Lenexa, KS)

1xPSN; (100x 为 5mg/ml 青霉素, 5mg/ml 链霉素, 10mg/ml 新霉素)(GIBCO - BRL, Gaithersburg, MD)

37℃培养48小时后培养基换成无血清培养基(表5)

表 5

250ml Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM),
250ml Ham F - 12 培养基(Fred Hutchinson 癌症研究中心, 西雅图, WA)
1mM 丙酮酸钠
0.29 mg/ml L - 谷氨酰胺
20mM 转铁蛋白(JRH, Lenexa, KS)
5mM 胰岛素(GIBCO - BRL)
16ng 硒(Aldrich, Milwaukee, WI)
1mg/ml 牛血清白蛋白(Sigma, St. Louis, MO)

37 ℃下培养细胞 72 小时。培养后, 或加入 PDGF - BB(10ng/ml) 或加入 10%胎牛血清到细胞中以刺激组织因子表达(Taubman 等人, 临床医学研究, 91 : 547 - 552, 1993)。监测一套平行的既无 PDGF 也无血清的未受刺激的细胞中的内源性活性。培养 6 小时后, 细胞中加入重组人因子 VIIa 至终浓度 10nM。以不加入因子 VIIa 的一套细胞为阴性对照。细胞在 37 ℃培养 2 小时, 用 HEPES 缓冲液(10mM HEPES, 137mM NaCl, 4mM KCl, 5mM CaCl₂, 11mM 葡萄糖, 0.1%BSA)洗涤。洗涤后, 细胞与每孔 50ml 的 200nM 血浆纯化的人因子 X(补加 5mM CaCl₂ 的 Tris - 缓冲盐液中)培养 5 分钟。每孔中加入 25μl 0.5M 的 EDTA 及 25ml S - 2222 产色底物(Kabi Pharmacia, Franklin, OH)的 800mM 溶液。室温下孵育平皿 40 分钟, 用 THERMOMAX 微孔板读数仪(Molecular Devices, Menlo Park, CA)在 405nm 分析。

表 6 显示用因子 VIIa 处理过的孔与对照孔相比(无因子 VIIa 加入)吸光度增加。吸光度增加是孔中产生的因子 Xa 水平的直接测定, 其随后切割产色底物, 释放出产色团。数据也表明用 PDGF - BB 或 10%胎牛血清预处理的孔中产色活性水平比未刺激的细胞高。

表 6

测试样品	OD ₄₀₅
对照	0.043
内源性	0.247
PDGF - BB	0.360
10%FCS	0.342

这些结果清楚地显示在大鼠平滑肌细胞的细胞表面上因子 X 到因子 Xa 转变是一种因子 VIIa 依赖性活化。

实施例 VII 通过 DEGR - 因子 VIIa 的细胞表面产色活性的抑制

如前述将大鼠血管平滑肌细胞接种于 96 孔板中。如前述在无血清培养基中培养细胞 72 小时，添加 10%胎牛血清 6 小时以刺激组织因子表达。刺激后，每孔中分别加入缓冲液(对照)，或 10nM 因子 VIIa，或[10nM 因子 VIIa+100nM DEGR - 因子 VIIa]。细胞在 37℃培养 2 小时后，用 HEPES 缓冲液洗。洗涤后，细胞与每孔 50ml 的 200nM 因子 X(补加 5mM CaCl₂ 的 Tris 缓冲盐溶液中)一起培养 5 分钟。每孔中加入 25 μl 0.5M EDTA 和 25ml S - 2222(800mM)产色底物(Kabi Pharmacia)。室温下培养细胞 40 分钟。如前述在 405nm 处分析产色活性。

表 7 显示仅用因子 VIIa 处理的孔中产色活性的刺激，以及当 DEGR - 因子 VIIa 与因子 VIIa 共培养时刺激的抑制。这些结果显示，DEGR - 因子 VIIa 作为因子 VIIa 结合的竞争性拮抗剂，抑制因子 X 转变为因子 Xa 的活性，随即抑制 S - 2222 色原的切割。

表 7

测试样品	OD ₄₀₅
对照	0.035
因子 VIIa	0.342
因子 VIIa+ DEGR - 因子 VIIa	0.073 0.73

实施例 VIII DEGR - 因子 VIIa 对大鼠平滑肌细胞上细胞表面产色活性的剂量依赖性抑制

大鼠血管平滑肌细胞以 4,000 个细胞/孔接种于 96 孔培养皿的补加 1%胎牛血清的生长培养基中(如表 4, 无 10%胎牛血清)。5 天后除去培养基, 细胞中或是仅加入浓度增加的因子 VIIa, 或是与增加浓度的 DEGR - 因子 VIIa 一起加入 10nM 因子 VIIa。细胞与因子 VII 混合物 37℃ 下一起培养 2 小时。培养后, 洗涤细胞且与 50ml 200nM 的因子 X(Tris 缓冲盐水中)室温下培养 5 分钟。每孔中加入 0.5M EDTA 25ml 及 800mM S - 2222(Kabi Pharmacia)25ml, 室温下培养平皿 40 分钟。如前述用微孔板读数仪在 405nm 处分析产色活性。

表 8 显示了随着加入孔中因子 VIIa 量的增加产色活性的剂量依赖性增加。当 DEGR - 因子 VIIa 与 100nM 因子 VIIa 混合物加入细胞时(表 9), 存在产色活性的剂量依赖性抑制。1 : 1 摩尔比的 DEGR - 因子 VIIa : 因子 VIIa 抑制产色活性的约 95%。这些数据表明此实验设计中 DEGR - 因子 VIIa 对培养中的平滑肌细胞的细胞表面组织因子的亲和力比天然因子 VIIa 明显要高。如果 DEGR - 因子 VIIa 与因子 VIIa 对结合组织因子有同等亲和力, 则当两种分子以等摩尔比加入到细胞中所观察到的抑制水平不会如此高。

表 8

因子 VIIa 浓度 (nM)	OD ₄₀₅
0.01	0.005
0.39	0.025
1.56	0.058
6.25	0.111
25.00	0.154
100.00	0.208

表 9 显示由 DEGR - 因子 VIIa 对大鼠平滑肌细胞的因子 Xa 产色活性的剂量依赖性抑制。DEGR - 因子 VIIa 增加的浓度与 100nM 因子

VIIa 共培养，因子 Xa 产色活性用产色底物 S - 2222 测定。

表 9

DEGR - 因子 VIIa 浓度(nM)	OD₄₀₅
0.10	0.208
0.39	0.176
1.56	0.116
6.25	0.073
25.00	0.026
100.00	0.014

实施例 IX 在可溶性组织因子实验中通过 DEGR - 因子 VIIa 对因子 Xa 产生的抑制

通过产色实验建立使用纯化的重组可溶性组织因子的因子 X 到因子 Xa 的转变。组织因子从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)(Shigematsu 等人, 生物化学杂志(*J. Biol. Chem.*)267 : 21329 - 21337, 1992)中表达并纯化。可溶性组织因子由 W.Kisiel 博士纯化并表征(新墨西哥大学)。制备含有 65.9ml 可溶性组织因子(2.2mM), 29.0ml PCPS(1mM, Sigma, St. Louis, MO), 29.5ml 人因子 X(4.1mM), 2.77ml Hank 缓冲液(25mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 2.7mM KCl, 5mM CaCl₂, 0.1%BSA)的反应混合物。96 孔板中每孔加入 40 μ l 组织因子/因子 X 混合物, 25ml 用 TBS 稀释的因子 VIIa 及 25ml 用 TBS 稀释的 DEGR - 因子 VIIa。也使用了 40ml 组织因子/因子 X 混合物; 25ml 用 TBS/稀释的因子 VIIa 以及仅有 25mlTBS 的对照。10 μ l S - 2222(4mM)产色底物加到孔中的反应混合物中且在室温培养 2 ~ 10 分钟。如前述在微孔板读数仪在 405nm 处分析结果。

利用在无 DEGR - 因子 VIIa 条件下因子 VIIa 浓度的增加确定因子 VIIa 活化因子 X 的标准曲线。列于表 10 中的结果表明, 随着加入到反应混合物中因子 VIIa 量的测量产色活性呈剂量依赖性增加。不同量的

DEGR - 因子 VIIa 和 100nM 因子 VIIa 的同时加入导致产色活性的剂量依赖性减少(表 11)。这些数据表明, DEGR - 因子 VIIa 作为天然因子 VIIa 结合可溶性组织因子的竞争性拮抗剂, 因而抑制因子 Xa 的产生, 如通过针对产色底物 S - 2222 的产色活性的降低所测。

表 10

以增加浓度的因子 VIIa 加入到可溶性组织因子的因子 Xa 产色活性的刺激。用产色底物 S - 2222 测定光密度的改变。

因子 VIIa 浓度(nM)	OD ₄₀₅
0.78	0.168
1.56	0.288
3.12	0.478
6.25	0.694
12.50	0.764
25.00	0.790
50.00	0.738
100.00	0.770

表 11

通过在天然因子 VIIa 存在下向可溶性组织因子加入 DEGR - 因子 VIIa 测定对因子 Xa 产色活性的抑制。用产色底物 S - 2222 测定光密度的改变。

DEGR - 因子 VIIa 因子(nM)	OD ₄₀₅
0	0.810
50	0.750
100	0.609
200	0.296
400	0.167
800	0.083
1600	0.055

实施例 X 通过 DEGR - 因子 VIIa 对凝血的抑制

监测 DEGR - 因子 VIIa 对凝血时间的作用的标准凝血实验准备如下：100ml 正常狒狒血浆(用作为抗凝剂的柠檬酸钠收集)加入到以 TBS(20mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl)稀释的 100ml 不同 DEGR - 因子 VIIa 浓度的溶液中。样品混合后在 37 °C 短暂孵育。样品加入 Electra 800 自动凝血计时仪(医学实验室自动化公司, Pleasantville, NY)中。孵育后, 含有 25mM CaCl₂ 的 200ml 组织因子制剂加入到 DEGR - 因子 VIIa 制剂。组织因子制剂以源自新鲜冷冻脑组织的狒狒脑盐水提取物形式制得, 用其引发狒狒血浆凝血的能力表征。选择凝血时间在约 40 秒钟的组织因子的浓度。

列于表 12 的数据表明凝血时间的剂量依赖性增加是由于 DEGR - 因子 VIIa 的添加。血浆中低至 1mg/ml DEGR - 因子 VIIa 导致凝血时间的明显增加。

表 12 DEGR - 因子 VIIa 导致的凝血时间的剂量依赖性增加

DEGR - 因子 VIIa(μ g/ml 血浆)	凝血时间(秒)
0	40.7
0.5	46.2
1.0	50.8
2.5	64.5
5.0	108.1
10.0	158.4

实施例 XI DEGR - 因子 VIIa 对血小板积累的抑制

分析了 DEGR - 因子 VIIa 的对非人的灵长类中由于机械性损伤在动脉血栓处血小板积累的抑制能力。在狒狒中使用主动脉动脉内膜切除术模型, 基本上如 Lumsden 等人所述(血液(blood), 81:1762 - 1770(1993))。长度为 1 - 2cm 的狒狒主动脉部分被切下, 翻转并刮擦以除去动脉的内膜及约 50%的中膜。动脉回复到其正确方向, 两端插管, 置于狒狒的一条体外旁路中, 从而通过此旁路将机械性损伤的动脉暴露于血液。在打开

旁路到循环血液之前，用 ^{111}In 标记的自体血小板静脉注射到动物中。利用实时 γ 照像仪测定在损伤动脉位置累积的血小板的水平。

利用在即将打开旁路前 DEGR - 因子 VIIa 或对照盐水的大量注射进行 DEGR - 因子 VIIa 对血小板累积抑制的评价。对损伤的动脉连续测量 60 分钟。0.005mg/kg VIIa 剂量的 DEGR - 因子抑制血小板累积。在以 1.0mg/kg 量注射时，在给药后 1 小时约 90% 的血小板累积被抑制。结果见图 2。

这些数据表明，用 DEGR - 因子 VIIa 抑制组织因子可明显抑制动脉血管损伤的非人灵长类模型中富含血小板的血栓的形成。

实施例 XII 在动脉粥样硬化兔中气囊血管成形术后 DEGR - 因子 VIIa 抑制血管再狭窄

在新西兰白色(NZW)动脉粥样硬化兔中气囊血管成形术后评价 DEGR - 因子 VIIa 的调节损伤形成的能力。此动物模型已被很好的表征且已证明是用于评价抗血栓化合物对血管损伤形成的作用的好模型(Gimple 等人, 循环(Circulation)86 : 1536 - 1546(1992), 及 Rogosta 等人, 循环 89 : 1262 - 1271(1994))。用于评价 DEGR - 因子 VIIa 的动物模型基本如 Ragosta(出处同前)所述。

通过向兔肌内注射 5mg/kg 甲苯噻嗪和 35mg/kg 氯胺酮麻醉动物。通过在腹股沟韧带下方切开暴露近端股动脉,在近端和远端结扎。用 27 号针头插入分离的部分。通过针刺造口。分离的片段用盐水灌满以消除残余血液, 通过以 80ml/min 速度的空气注入干燥 8 分钟。空气干燥后, 分离的片段再次用盐水灌满, 除去结扎。用非闭塞性局部压迫维持止血。用金属钳分开此片段。在局部用 1%甲苯噻嗪处理局部痉挛。手术后一天, 动物用 1%胆固醇和 6%花生油饲养一个月直至气囊血管成形术。口服对乙酰氨基酚(Tylenol) 10mg/kg 3 ~ 5 天以缓解手术后疼痛。在手术后的 3 ~ 5 天内给 1cc 的 Ambipen。

用于动物的测试药物输送包括初始大量注射后立即施气囊血管成形术, 随后利用渗透泵通过内部颈静脉进行连续的全身性注入。注入药物持

续 3 天。对照动物在接受肝素(150U/kg, 静脉注射)后进行气囊血管成形术, 随后再用盐水注入。用 DEGR - 因子 VIIa 处理过的动物在接受 1mg/kg 大剂量注射后以 50mg/kg/hr 注入。

为了用于连续全身性注入的渗透泵的置入, 如前述麻醉动物, 在全部过程中另外肌肉内注射甲苯噻嗪和氯胺酮维持。通过颈部中线切开, 用钝器解剖法分离右内部颈静脉, 远端结扎。用硅化橡胶管(PE - 160)导入到右内部颈静脉。制备皮下通路以使硅化橡胶管穿过。此管与渗透泵连接。渗透泵在兔背的皮下植入。右公用颈动脉用钝器解剖法分开, 远端结扎。通过动脉切开术, 将 5F 导管插入器在主动脉弓连接之前置入。抽血以确定止血参数, 药物和胆固醇水平。动脉内注射 20mg 甲苯噻嗪。通过位于主动脉分支处上方的 5F Berman 导管用手注射 3 ~ 4ml 泛影钠 - 泛影葡胺进行对照主股动脉血管造影。

除去 Berman 导管后, 在下行主动脉和位于主动脉分支上方位置中导入 0.14 英寸的导线。在荧光镜指导下, 引入 2.0 到 2.5mm 的合适大小的气囊血管成形术导管, 且在导线之前置于横跨狭窄处。用手动充气机充胀气囊到 6 个大气压 60 秒。在三次充胀之间有 60 秒间隔。在每个动物中的两个股动脉均进行此过程。

气囊膨胀后, 撤除血管成形术导管, 将 Berman 导管再次引入到主动脉分支上方 3cm 位置。在动脉内给 20mg 利多卡因以减少痉挛。如前述进行血管造影术后程序。在股动脉水平定出一个 1cm 格以计算实际直径。然后再除去导管。用 3 - 0 丝线结扎右颈动脉, 逐层缝合伤口。如上述施用 Ambipen 和对乙酰氨基酚。

在测试化合物的即将大量注射前, 注射 1 小时后以及在 3 天连续注射结束时测定血液中 DEGR - 因子 VIIa 浓度和凝血酶原时间。获得柠檬酸化的血浆 1 ~ 2 毫升, 测定凝血酶原时间和抗原水平。

下面的标准凝固实验用于监测对照和 DEGR - 因子 VIIa 处理的动物中的凝血酶原时间。25 μ l 测试的兔血浆(用作为抗凝剂的柠檬酸钠收集)加入到 150mlTBS 中(20mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl.)。混合样品且加入 Electra 800 自动凝血计时仪(医学实验室自动化公司, Pleasantville,

NY)。培养后，含有 25mM CaCl_2 的 200ml 促凝血酶原激酶制剂(Sigma Chemical)加入到血浆制剂中。选择在对照兔血浆中约 20 秒产生凝血的时间的促凝血酶原激酶浓度。

用 ELISA 实验测定来自对照和 DEGR - 因子 VIIa 处理的兔的血浆样品中的 DEGR - 因子 VIIa 浓度。实验包括首先在 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中稀释抗人因子 VII 单克隆抗体(W.Kisiel 博士，新墨西哥大学)到 2.0mg/ml，且以 100ml/孔加入到 96 孔板中。平板在 4℃ 下孵育过夜，随后用洗涤缓冲液(PBS, pH7.4, 含 0.05% Tween20)洗两次。每孔中用 200ml 封闭缓冲液(PBS, pH7.4, 含 0.05% Tween 20 和 1% 牛血清白蛋白)封闭非特异性结合位点，37℃ 孵育 2 小时后再用洗涤缓冲液洗涤。

封闭后，范围从 20 到 0.027ng/ml 的 DEGR - 因子 VIIa 标准稀释系列与测试的兔血浆(在封闭液中 1 : 100 ~ 1 : 4000)的稀释系列一起加入，每孔中 100ml。非免疫兔血浆用作阴性对照。平皿 37℃ 培养 1 小时后用洗涤缓冲液洗涤 4 次。

通过加入每孔 100ml 封闭缓冲液中 1 : 1000 的兔抗人因子 VII 多克隆抗体稀释液(Kisiel 博士，新墨西哥大学)检测 DEGR - 因子 VIIa。37℃ 下培养平皿 1 小时后再用洗涤缓冲液洗 5 次。用每孔 100 毫升 1 : 2000 稀释的山羊抗兔 IgG 抗体辣根过氧化物酶偶联物(Tago 公司)检测特异性抗体结合。37℃ 下培养平皿 1 小时，用洗涤缓冲液洗 6 次。最后，加入 100ml 底物溶液(0.2M 柠檬酸盐缓冲液中的 0.42mg/ml 二盐酸化邻苯二胺 [OPD]，pH5.0, 含 0.3% H_2O_2)。室温下 1 ~ 3 分钟后，通过加入 100ml/孔的 1N H_2SO_4 终止颜色反应，在微孔板分光光度计上于 490nm 测定平板读数。通过与那些 DEGR - 因子 VIIa 标准曲线比较未知物的 A_{490} 值测定血浆样品中 DEGR - 因子 VIIa 浓度。

对血浆样品的凝血酶原时间和 DEGR - 因子 VIIa 抗原水平的分析分别见表 13 和表 14。数据代表每个单独的动物。表 15 显示平均凝血时间的总括。在所有情况中，DEGR - 因子 VIIa 处理过的动物在注射后 1 小时时间点的凝血酶原时间延长，在注射后第 3 天时间点凝血酶原时间回复到接近处理前的水平。DEGR - 因子 VIIa 抗原水平的分析也显示在 1 小

时时间点血浆中的 DEGR - 因子 VIIa 水平较高，其血浆中范围在 2 - 6mg/ml 之间，在第 3 天时间点上循环水平很低。在 1 小时时段测得的 DEGR - 因子 VIIa 水平与预计的凝血酶原时间增加相一致，通过在体外以 DEGR - 因子 VIIa 强化正常兔血浆测定 DEGR-因子 VII 水平，在标准稀释促凝血酶原激酶实验中测定凝血酶原时间。

表13				
凝血酶原时间测定				
		凝固时间（秒）		
动物编号	处理	处理前	1 小时	3 天
73	对照	24.8	22.3	17.8
74	对照	24.8	27.9	18.6
75	对照	24.6	N/D	20.5
76	对照	22	N/D	17.9
169	对照	21.2	22.9	22
170	对照	24.9	23.5	18.6
173	对照	25.9	21	20.8
174	对照	25	29.4	20.1
77	DEGR-FVIIa	22.5	40.1	18.3
78	DEGR-FVIIa	24.3	34	20.9
80	DEGR-FVIIa	24.7	50	21.7
96	DEGR-FVIIa	N/A	N/A	21
97	DEGR-FVIIa	23.6	33.3	21.2
171	DEGR-FVIIa	20.6	45.8	21.9
172	DEGR-FVIIa	23.5	41.6	22.4

N/A = 无数据

表14				
ELISA检测兔血浆中DEGR-因子VIIa				
		FVIIa ELISA (ng/ml)		
动物编号	处理	处理前	1 小时	3 天
73	对照	0	13	0
74	对照	36	14	4
75	对照	0	N/A	9
76	对照	0	N/A	14
169	对照	0	0	1
170	对照	0	0	0
173	对照	36	31	0
174	对照	87	86	160
77	DEGR-FVIIa	0	3,210	102
78	DEGR-FVIIa	1	4,950	7
80	DEGR-FVIIa	13	4,543	661
96	DEGR-FVIIa	65	4,900	117
97	DEGR-FVIIa	4	4,600	502
171	DEGR-FVIIa	13	2,145	212
172	DEGR-FVIIa	9	2,830	228

N/A = 无数据

表 15 血浆凝固时间的统计学总结**不成对的 t - 检验 X****流血前**

DF:	不成对的 t 值	概率(双尾):
12	1.12	0.2852

组:	数量	均值	标准离差	标准误差
对照	8	24.15	1.64	0.58
DEGR - VIIa	6	23.2	1.48	0.60

不成对的 t - 检验 X**血管成形术后 1 小时**

DF:	不成对的 t 值	概率(双尾)
10	- 5.44	0.0003

组:	数量	均值:	标准偏差:	标准误差:
对照	6	24.5	3.35	1.37
DEGR - 因子 VIIa	6	40.8	6.53	2.67

不成对的 t - 检验 X**血管成形术后 3 天**

DF:	不成对的 t 值	概率(双尾)
13	- 2.04	0.0622

组:	数量	均值:	标准偏差:	标准误差:
对照	8	19.54	1.53	0.54
DEGR - 因子 VIIa	7	21.06	1.33	0.50

如前述血管成形术三周后通过左颈动脉在处死前重复一次随访血管造影术。通过一垂直的下腹部切口，分离远端主动脉，近端剥离，在主动脉分支处插入灌注管。远端主动脉用 50ml 盐水冲洗后再在体内用 500ml Histochoice (AMRESCO, Solon, OH) 溶液以 120mm Hg 注入超过 15 分钟

以固定。一旦灌注开始,用过量戊巴比妥钠(3ml 巴比妥钠 IV, 65mg/ml)处死。5cm 段股动脉被对侧切割。组织保存于 Histochoice 溶液中用于光学显微镜观察。

为测定在气囊血管成形术位点内膜损伤的形成,将被切除的股动脉切成连续的 3mm 切片,包被在石蜡中,切片切自每个动脉的各种区域。切片固定于玻璃载玻片上,用苏木精和伊红及姬姆萨染色法染载玻片。用 Bioquant Program 进行形态测量分析以获得腔、内膜和中膜的面积测量。对来自损伤动脉的组织切片进行形态测量分析,测量总腔面积;内膜面积的测定则通过测量内弹性层之内的面积减去相应的来自每一组织切片的腔面积得到;中膜面积则通过测量外弹性层之内的面积再减去内弹性层之内的面积得到。测定对照和用 DEGR - 因子 VIIa 处理过的动物的股动脉中内膜损伤的测量表明用 DEGR - 因子 VIIa 处理过的内膜尺寸明显减少(表 16)。相反,在两组中中膜面积的测量无明显差异。

表 16. 气囊血管成形术处理过的兔的内膜和中膜的测量				
组	数量	内膜(mm ²)	标准偏差	概率(双尾)
对照	13	0.819	0.414	0.0138
DEGR - FVIIa	10	0.438	0.192	
组	数量	中膜(mm ²)	标准偏差	概率(双尾)
对照	13	0.389	0.098	0.172
DEGR - FVIIa	10	0.329	0.105	

来自血管成形术测量的数据列于表 17, 如对照和 DEGR - 因子 VIIa 处理过的动物的全部三个时间点: 即将施行血管成形术之前, 血管成形术后立即, 及血管成形术之后 21 天的平均腔直径(MLD)+/- 标准偏差。在对照和 DEGR - 因子 VIIa 处理过的动物之间的血管成形术前或后测量的 MLD 无明显差异。然而观察到在用 DEGR - 因子 VIIa 处理过的动物中血管成形术之后测量的 MLD 明显增加。

表 17 平均腔直径(MLD)的测量				
PTCA 前 MLD 测量				
组	数量	平均 MLD	标准偏差	概率(双尾)
对照	13	1.202	0.24	0.3883
DEGR-FVIIa	10	1.283	0.19	
PTCA 后 MLD 测量				
组	数量	平均 MLD	标准偏差	概率(双尾)
对照	13	1.492	0.551	0.5326
DEGR-FVIIa	10	1.323	0.725	
21 天时 MLD 测量				
组	数量	平均 MLD	标准偏差	概率(双尾)
对照	13	0.889	0.228	0.0001
DEGR-FVIIa	10	1.393	0.242	

实施例 XIII DEGR - 因子 VIIa 对狒狒平滑肌细胞(SMC)上细胞表面因子 Xa 产生的抑制剂

基本上如前面实施例 VIII 所述进行细胞表面产色鉴定以测量 DEGR - 因子 VIIa 在狒狒单层平滑肌细胞(SMC)上对因子 VIIa 与细胞表面的组织因子结合的封闭, 抑制随后因子 X 到因子 Xa 转变的功效。此方法是对如 Sakai 等人生物化学杂志(J.Bio.Chem.)264 : 9980 - 9980(1989)和 Wildgoose 等人, 美国国家科学院院报 87:7290 - 7294(1990)所述方法的改进。狒狒平滑肌细胞获自华盛顿大学, 西雅图, 美国, 且培养自主动脉外植体。狒狒平滑肌细胞以 8,000 细胞/孔的浓度接种于 96 孔培养皿的每孔 200ml 的 DEME 培养基(补加 10%胎牛血清)中, 在此培养基中 37 °C 下 5%CO₂ 中维持 4 天。鉴定时除去 110ml 培养液, 每孔中加入递增浓度的因子 VIIa 或与 DEGR - 因子 VIIa 一起加入因子 VIIa。得出因子 VIIa 浓度的标准曲线, 范围从 5nM 到 0.04nM。为测量 DEGR - 因子 VIIa

对因子 VIIa 活性的抑制活性, 每测试孔中在恒量因子 VIIa(5nM)存在下, 加入递增浓度的 DEGR - 因子 VIIa。因子 VIIa 和 DEGR - 因子 VIIa 均用 HEPES 缓冲液(10mM HEPES, 137mM NaCl, 4mM KCl, 5mM CaCl₂, 11mM 葡萄糖, 0.1%BSA)稀释, 且细胞中加入 10ml 10x 贮存液。细胞与测试化合物 37 °C 下一起培养 2 小时, 再用 HEPES 缓冲液洗 3 次。每孔中再加入 50 μ l 在 Tris 缓冲液(25mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 2.7mM KCl, 5mM CaCl₂, 0.1% BSA)中的 200nM 因子 X 溶液。室温下 4 分钟后, 加入 25ml 0.5M EDTA 以终止因子 X 向因子 Xa 的转变。每孔中加入 25 μ l 溶于 Tris 缓冲液的 0.8mM S - 2222(一种因子 Xa 特异性产色底物), 60 分钟后在 Thermomax 微孔板读数仪(Molecular Devices 公司, Menlo Park, CA)中 405nm 处读数。

图 3 所示结果表明, 因子 VIIa 处理过的孔中(空心方框)酰胺水解活性呈剂量依赖性增加。吸光度的增加是孔中产生的因子 Xa 水平的直接测量, 因子 Xa 随即切割产色底物。恒量因子 VIIa(5nM)中加入递增水平的 DEGR - 因子 VIIa 显示随着 DEGR - 因子 VIIa(实心方框)水平的增加, 酰胺水解活性呈剂量依赖性下降。与因子 VIIa 等摩尔比的 DEGR - 因子 VIIa 能抑制>90%的产色活性。即使在 DEGR - 因子 VIIa 的水平低 10 倍时, 仍有对因子 Xa 产色活性产生 40%的抑制。这些结果支持了 DEGR - 因子 VIIa 是一种完整细胞单层平滑肌细胞表面上因子 VIIa 使因子 X 向因子 Xa 转变活化的极强有力的拮抗剂的结论。

实施例 XIV DEGR - 因子 VIIa 对狒狒中血管血栓形成及血管损伤形成的影响

测试了人 DEGR - 因子 VIIa 抑制在非人灵长类中组织因子(TF)和活化的因子 VII(因子 VIIa)调节血管损伤形成(VLF)的能力, 此 VLF 是由机械性血管损伤诱发的。

在即将于狒狒中创造机械性血管损伤之前开始静脉注射 DEGR - 因子 VIIa 7 天(5 只动物)或 30 天(1 只动物)。在第 30 天进行血管损伤形成测量。5 只处理过的动物的结果与 5 只同时注入缓冲液的对照的结果比较。

测定关于实验动物的基础值: a)血小板计数,中性粒细胞计数,单核细胞计数及红细胞计数; b)血浆纤维蛋白原水平; c)血浆凝固因子 VII, VIIa, X 和 V 的活性水平以及因子 VII 的抗原性水平; 和 d)抗因子 VIIa 抗体水平的基线血浆样品。

在三氟溴氯乙烷麻醉及无菌操作条件下, 用自体 ^{111}In - 血小板标记过的动物使用连续静脉内给药的 tether 系统接受 DEGR - 因子 VIIa 静脉内注入(初始注射 1mg/kg, 随后连续静脉内注入 50mg/kg/hr)。动物接受颈动脉动脉内膜切除术、对侧肱动脉或对侧股动脉 Fogarty 气囊导管血管成形术的手术。

利用 tether 系统通过静脉导管连续注入以施用 DEGR - 因子 VIIa7 到 30 天。手术后 30 天用三氟溴氯乙烷麻醉动物, 用含 0.1%戊二醛的 4%多聚甲醛在原位加压灌注固定 30 分钟。那时, 用 Harker 等人, 循环 (Circulation)83:41 - 44(1991) 和 Hanson 等人, 高血压 (Hypertension)18:1170 - 1176(1991)的方法收集血管片段(含有先前损伤过的位置)。样品在体外固定后(含 0.1%戊二醛的 4%多聚甲醛)低温保藏 (Cryopreserved)且加工用于损伤程度的形态测量学分析。

研究了 11 只正常成年狒狒(Paio anubis)。其中 6 只动物接受 DEGR - 因子 VIIa 的注入(50mg/kg/hr), 剩余 5 只为不接受 DEGR - 因子 VIIa 的对照动物。在采用前将动物去蠕虫且经三个月观察无疾病。全部过程经研究性动物关怀及使用委员会批准并遵守由 NIH 关于实验室动物的关怀及使用指南列出的操作及方法, 以及动物保护法案和相关研究性政策。在用氯胺酮(10mg/kg 肌肉注射)和安定(0.5mg/kg 静脉内注射)诱导后在三氟溴氯乙烷麻醉下进行侵入性过程。为了在随后的手术后进行的实验性操作中短期固定, 使用盐酸氯胺酮(5 - 20mg/kg, 肌肉注射)。

用 Hanson 等人, 高血压, 18:1170 - 1176(1991)和 Krupski 等人, 循环 84:1749 - 1757(1991)所述的技术(此处引入作为参考)通过颈中线切口完成颈动脉动脉内膜切除术。使用动脉内膜切除术作为血管损伤模型是因为其临床上的相关性, 以及已证实正常动脉的动脉内膜切除术诱导的 VLF 具有可重复性。简言之, 从锁骨近侧到颈动脉分支远端的共用颈动

脉被无包围组织的切下。大量注射硫酸盐肝素(100U/kg 静脉内注射, Elkins - Simm 公司, Cherry Hill, NJ)后 3 分钟用置于暴露血管两端的无创伤血管夹交叉夹住其用颈动脉, 且近侧与远端交叉夹分开 1cm。再将近侧动脉段在弯钳上翻转。在获得最大翻转后, 将一对聚丙烯驻留缝线(7 - 0)置于任一端近侧, 将另一对置于暴露出腔的片段的近端。从翻转血管段分隔端的 1cm 处开始进行动脉内膜切除术, 持续达测量长度为 1cm。此步骤包括利用弯钳和手术显微镜(32x 放大倍数)将正常内膜和中膜的部分厚度机械性除去。动脉内膜切除术后, 血管回复到正常构象, 用 7 - 0 聚丙烯缝线进行末端对末端的吻合术及在 2.5 倍放大倍数下连续操作将伤口逐层缝合。

为了对 VLF 进行形态测量分析, 包埋在石蜡中且用苏木精 - 伊红染色相连组织成分(胶原, 弹性蛋白)的部分利用带有影像分析系统(Thomas 光学测量系统, Columbus, GA)的 Zeiss 透视镜评价, 此显像分析系统含有带高分辨率(700 线)监视器的高分辨率(580 线)CCD 显微镜照相机, 一块 IBM386 芯片, 带有用于显像捕获和贮存的高分辨率图像分析仪的 80MB 计算机。用形态测量软件进行定量显像分析(Optimas, Bioscan 公司, Edmonds, WA)。针对新内膜增生性损伤的总面积及相应的动脉中膜面积分析动脉截面。为进行统计学分析, 利用成对和不成对数据的学生检验(双尾)比较不同的组。

结果显示在用 DEGR - 因子 VIIa 处理 7 天后在第 30 天进行研究的动物中的内膜面积与经过同样血管损伤但未接受任何 DEGR - 因子 VIIa 的对照动物相比明显下降(图 4)。在用 DEGR - 因子 VIIa 处理 30 天且在第 30 天检查的动物中也发现类似结果。

利用气囊血管造影肱动脉模型的初步研究表明, 用 DEGR - 因子 VIIa 治疗无可检测的益处。然而此模型已证实在狒狒中是一个组织因子起关键作用的凝血酶原模型。

狒狒中的股动脉气囊损伤研究的确表明与对照相比, DEGR - 因子 VIIa 有统计学上明显的益处, 如图 5 所示。

实施例 XV DEGR - 因子 VIIa 对 tPA 诱导的血栓溶解的影响

在急性心肌梗死过程中进行性冠状动脉血栓形成主要是由与因子 VIIa 复合的组织因子通过外源性凝血途径调节。确定了在外源性途径中的不同位点辅助性凝血级联反应抑制对组织型纤溶酶原激活剂(TPA)血栓溶解的影响。

带有电子诱导冠状动脉血栓的正在用 tPA(1mg/kg, 20 分钟以上)溶栓的 36 只狗分别被给予四种辅助性治疗的一种: 9 只接受 30mg/kg/min 的蟬抗凝固肽(TAP, 一种选择性因子 Xa 抑制剂)90 分钟。在 9 只狗中 TF - 因子 VIIa 复合物被重组组织因子途径抑制剂(TFPI)(100 - 150mg/kg/min, 90 分钟)抑制, 在另 9 只狗中被 DEGR - 因子 VIIa(1 ~ 2mg/kg 次) (作为活化的因子 VIIa 竞争性拮抗剂)抑制。还有 9 只狗接受盐水对照。在溶栓后观察狗的再闭塞 120 分钟。这些试剂对溶栓功效的影响见下表 18(数据为平均 $\pm$ SD)

表 18

	盐水	DEGR-因子 VIIa	TFPI	TAP
复流开始时间(分钟)	32 $\pm$ 13	20 $\pm$ 7*	21 $\pm$ 6*	18 $\pm$ 10*
复流持续时间(分钟)	62 $\pm$ 45	70 $\pm$ 48	91 $\pm$ 35*	120
循环血流变化	70%	89%	56%	0%
再闭塞	70%	78%	67%	0%

* 数值与盐水对照的差异为 0.05 显著性水平。

这些数据表明, 由 DEGRVIIa 或 TFPI 封闭因子 Xa 或 TF - 因子 VIIa 造成的外源性途径的抑制加速了 t - PA 诱导的血栓溶解。选择性因子 Xa 抑制剂在成功再灌注后维持动脉开放更为有效。

实施例 XVI 修饰过的因子 VIIa 对血管内血栓形成的抑制不影响系统性凝血

为确定与 TF 结合的因子 VII 的抑制是否会导致抗血栓形成作用, 通过将外用缩窄器置于内皮损伤的兔颈动脉周围(Fott's 模型)引发由于复发

的血栓形成造成的循环血流变化(CFV)。利用置于缩窄器近端的 Dopple 流量探测器连续测定颈动脉血流。在动脉周围放置缩窄器后, 6 只兔中的 6 只形成平均频率 11 ± 2 循环/小时的 CFV, 而在 CFV 最低点颈动脉血流速度平均为 $5 \pm 2\%$ 基线值。观察 CFV30 分钟后, 动物接受人重组活性位点封闭的 (Phe - Phe - Arg 氯甲基酮) 因子 VIIa(因子 VIIai)(0.1mg/kg/min, 10 分钟)的注入。因子 VIIai 完全消除了 6 只动物中 6 只的 CFV(CFV 频率=0 循环/小时; $P<0.05$; 颈动脉血流速度=106.9% 基线值; $p=NS$, 相对于基线基)。CFV 抑制 30 分钟后, 以 0.1mg/kg/min 的剂量注入人重组因子 VIIa10 分钟。因子 VIIa 的注入在所有动物中恢复了 CFV, 这表明因子 VIIa 与 TF 的结合是竞争性的。在因子 VIIai 注入后与基线值相比, 凝血酶原时间、活化的部分促凝血酶原激酶时间、应答 ADP 和凝血酶的离体血小板沉积均无差异。因此, 在体内引发血栓形成中, 因子 VII - VIIa 起了重要作用。因子 VIIai 的施用在此模型中表现出不影响系统性凝血的强的抗血栓形成作用。

实施例 XVII 通过局部施用修饰过的因子 VIIa 抑制微动脉血栓

在血管手术、微血管再造手术或再植手术中, 最常见的失败原因是在吻合处的血栓。当血管经过创伤、显示出病理性改变或当使用介入性静脉移植物时闭塞性血栓形成的风险大大增加了。因而, 抗血栓形成性干预经常与手术一起使用。目前可得的用于此目的的物质以非肠道途径(肝素, 葡聚糖)或口服途径(ASA)施用且均带有出血副作用。此外, 肝素和尤其是 ASA 在防止(动脉)血栓形成时仅部分有效。由于这些缺点, 需要在血管手术中使用防止血栓的一种试剂, 此试剂能通过可被局部运输的物质的方式在吻合术区域和血管损伤位置结合且发挥功效, 避免不期望的系统性副作用。此实施例中, 活性位点失活的因子 VIIa 在动脉损伤位点的局部施用用于产生不会诱发出血增加或其它止血缺陷的倾向的抗血栓形成作用。

方法:

重为 ~ 3.5kg 的瑞典鲁普兔(Swedish Loop)(雌、雄均可)用标准糖丸饲料和随意量的水喂养。用前在实验室观察至少一周无疾病。

边缘耳静脉插管, 用巴比妥钠(18mg/kg)麻醉且重复注射以维持。

双侧耳引出皮瓣, 制备中央动脉 3cm 长的片段(外径 ~ 1mm)。所有分支用 10 - 0 缝线连接和切割。操作区用等渗盐水冲洗且盖上薄塑料膜。为了保持高且恒定的血流量和防止痉挛, 将动物置于热垫上且保持在约 39.5 °C 的(正常体温约 38.5 °C)稍高体温下, 在操作后向血管局部施用 3 滴 10mg/ml 利多卡因(再灌注后及再灌注后第 30 分钟测试开放度后)。

两侧血管同时置于双微血管夹中(S&T2V, S&T 市场有限公司, Neuhausen, 瑞士), 分离两个夹子之间 7mm 动脉片段。进行纵向动脉切开术(7mm)后使两个夹子接近, 血管复位后将血管腔翻转弄平, 暴露中膜的深层。用连续 10 - 0 单线尼龙缝线闭合动脉切口(Ethilon 10 - 0BV - 75 - 3, Ethicon 有限公司, Edinburg, 英国)。全部手术操作由一名外科医生用高质操作显微镜(Wild M - 650, Leica - Heerbrugg, Heerbrugg, 瑞士)进行。

通过打开血管夹使血管同时再灌注。迅速用盐水浸透过的纱布盖上, 每分钟检查一次。记录动脉切开术出血完全终止的时间。

再灌注后 30 和 120 分钟, 用标准显微外科空/满(empty/refill)测试评价血管开放度: 用一对微弯钳轻轻地在损伤面远端堵塞血管, 用另一对弯钳在下游腾空。释放第一对弯钳后, 评价血管的再充满, 血管分类为开放的或闭合的。闭合的血管表现为不再充满, 而开放的血管表现为或快或慢的再充满, 后者被称作“降低的开放度”。在最终的开放度测试后, 切下血管并纵切开, 移出血栓性物质并称量。

化合物:

浓度为 3.1mg/ml 的重组化学性灭活的人因子 VIIa(VIIai)或赋形剂以 200ml/份贮存在编号的小瓶。

实验方案:

以如下的随机双盲法处理 20 只兔，每只兔用作其自身对照：在如前述方法部分造成深动脉损伤后，一只耳的暴露的损伤部位用 VIIai 溶液(总量为 0.5mg)冲洗 5 分钟，另一只耳用赋形剂处理。冲洗过的创面使之在另一个 5 分钟过程中与溶液孵育，其后所有过量的溶液用等渗盐水冲洗净。闭合动脉切口且再灌注血管。

统计学方法：

利用体征(Sign)测试、血栓重量及动脉切开术出血数据等与 Wilcoxon 测试比较开放度结果。给出了双边(two-sided)P 值。

结果：

如开放率测试所得施用因子 VIIai 产生明显的抗血栓形成作用。在因子 VIIai 组中，再灌注后第 30 分钟血管开放度为 85%，第 120 分钟时为 75%。在赋形剂组中的相应值分别为 40%和 30%。此差异有统计学意义(分别为 $P=0.008$ 和 $P=0.004$)。因子 VIIai 组中中等血栓重量为 0.3mg，在赋形剂组中为 0.5mg，虽然此差异并不显著($P=0.19$)。因子 VIIai 组中的中等动脉切开术出血时间为 1.5 分钟，在赋形剂组为 2 分钟。两组之间统计学上无差异($P=1$)。

此实施例显示在动脉损伤位置局部施用因子 VIIai 可产生不引起出血倾向增加的抗血栓形成作用。这代表了用于预防由于手术、对血管的显微手术、血管成形术或其他损伤造成的血栓综合症治疗的高度有吸引力的模式。

实施例 XVIII 因子 VIIai 的局部应用减少血栓重量并增加开放度

此实施例证实了化学性灭活的因子 VIIa(因子 VIIai)的局部应用减少血栓重量并增加血管开放度。

20 只麻醉的兔用于此实施例。松动颈静脉并在夹子之间分离 10mm 片段。通过对内皮细胞的分离片段化学性(aetoxysclerol)破坏以及在该片段尾侧半限制性结扎的联合应用导入血栓。在双盲法中，一侧用 0.5mg 化

学性灭活的因子 VIIa(因子 VIIai)处理,另一侧用缓冲液处理。化学性破坏后将测试物质注射入分离的片段且孵育 10 分钟。30 和 120 分钟后用空/满测试控制开放度。处死后称量可能有的血栓。

	中等血栓重量	血栓重量范围	P-值	30 分钟时开放度	P-值	120 分钟时开放度	P-值
因子 VIIai	0.85mg	0 - 22.3mg		90%		85%	
缓冲液	9.3mg	0 - 26.8mg	0.035	55%	0.0070	50%	0.070

这些结果表明在静脉血栓模型中灭活的因子 VIIa 的局部应用明显减少血栓重量并提高开放度。

实施例 XIX 因子 VIIai 的应用减少危险面积并改善再灌注

方法

实验准备

研究了 28 只新西兰白兔(雌雄均有)(3.2 ~ 3.8kg)。简言之,用肌内施用氯胺酮(35mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)的混合物麻醉动物,插管且用恒体积呼吸机通气(Harvard 设备公司, Cambridge, MA)。聚丙烯导管通过左颈动脉置于主动脉及颈静脉中以分别监测动脉压力和药物的施用。通过第 5 个左侧肋间进行胸廓切开术并打开心包。聚丙烯导管置入左动脉心耳以用于以后的彩色微球注射。弯曲的冠状动脉的大边缘支用手术缝线圈套器将其从起始处临时性闭合约 0.3cm。维持冠状动脉闭合 30 分钟后,将结扎松开,使再灌注 5.5 小时。实验过程中连续记录(Gould 仪器)系统性动脉压力(Statham P23 DB 压力传感器)。

实验方案

在再灌注时,将动物随机分配到下列处理组中:左心房接受 5ml 盐水的对照组;用人重组的活性位点封闭的因子 VIIa(因子 VIIai, Novo Nordisk, A/S, Gentofte, 丹麦, 1mg/kg 注射入左心房)处理的组;用人重组活化的因子 VIIa(FVIIai, Novo Nordisk A/S, Gentofte, 丹麦, 1mg/kg

注射入左心房)处理的组。

危险面积、梗死尺寸和不复流现象的评价

为评价在实验终止时组织灌注的分布(“不复流”现象, NR), 通过左心房导管向动物注射 6% 的硫黄素 S 溶液(1mg/kg)。为获得梗死危险面积的评估, 注射硫黄素后立即将冠状动脉再闭合, 并通过左心房导管注射入单星蓝(E.I.DuPont; 1mg/kg)溶液。立即切割心脏, 将左心室从全部其他结构中切出并称重。左心室在 -70°C 冷冻 30 分钟, 并以平行于房室沟方向切成 8 ~ 10 片。正常灌注的心肌轮廓以及危险的面积均根据单星蓝的分布描绘于一个透明的塑料片上。再在紫外光下观察心肌切片, 按照硫黄素的分布正常灌注心肌的(荧光)则可明显地与缺血性心肌(无荧光)区分开来。这些区域也描绘于透明塑料片上。将切片 37°C 下再孵育在 2% 氯化三苯基四唑溶液(TTC, Sigma)中 10 分钟, 以观察坏死的面积。再次用透明塑料片描绘正常心肌(TTC - 阳性)和梗死心肌(TTC - 阴性)的轮廓。

计算下列变量: 1) 在再灌注期终点评价梗死危险面积占左心室的百分比(单星蓝分布)(AR); 2) 依 TTC 染色标准梗死尺寸(IS)占实际发展为坏死的面积的百分比; 3) 再灌注期终点不接受血流的危险面积的百分数(不复流现象, NR)。

局部心肌血流的测量

每处理组中的每只兔均测量局部心肌血流(RMBF)。不同颜色的塑料微球(兰、红和黄色, triton Technology, San Diego, CA)用于测量闭塞后 20 分钟、再灌注后 10 分钟和 5 小时的 RMBF。

微球尺寸为 $15 \pm 1 \mu$, 悬浮于含 0.01% Tween80 的 10% 葡聚糖溶液中。在即将使用前用超声波浴超声微球 5 分钟, 以保证充分分散。将约 500,000 个微球(总体积 0.5 ~ 1.0ml)注射入左心室导管。在微球注射前 1 分钟, 参比动脉血流开始减少且注射后持续 1 分钟。取自缺血性区域中央及取自非缺血性区域的组织样品(100 ~ 300mg)按 TTC 染色。按制造商指示, 再通过于 72°C 下于 4M KOH 溶液中消化 3 小时从组织中回收微球, 并通过在室温下于 16M KOH 溶液中消化后再经过微孔过滤, 从参比血样中回收微球。按照制造商指示, 从已知体积的溶剂(二甲基甲酰胺)中

回收染料,用分光光度计在可见光波长测定每种染色的浓度。每种染料溶液的组合光谱通过一种矩阵转换技术分解成单组分光谱。用下式计算每个心肌样品中的血流:

$RMBF = Fr \times Am/Ar$, 其中

RMBF = 每分钟心肌血流的毫升(ml/min),

AM = 心肌样品的吸光度, 及

AR = 参比血液样品的吸光度。

用样品湿重除心肌血流, 表示为 ml/min/g。

凝血研究

为测定因子 VIIai 和因子 VIIa 施用对系统性凝血的作用, 在基线和药物施用后 30 分钟测量凝血酶原时间(PT)和活化的部分凝血酶原激酶时间(aPTT)。在 0.5ml 柠檬酸钠中(3.8%)收集血液样品(4.5ml), 4℃下离心(2000g)10 分钟以分离血浆。从血液收集时 2 小时之内重复测定 PT 和 aPTT。

统计学分析

以平均值 $\pm$ SD 表示结果。变量分析用于组间的多重比较。对于带 Bonferroni 修正的不成对观察用学生 t - 检验测试单个组之间的差异。为比较组之间的血液动力学变量及局部心肌血流, 采用了带有用于重复测量的设计的双路(2 - way)变量分析。

结果

手术处理 28 只兔; 在分配到处理组之前两只兔在冠状动脉闭合过程中由于室颤死亡, 另外两只兔子在再灌注过程中死亡(一个为对照组, 另一只在用因子 VIIa 处理过的组)。这些动物从后续统计分析中排除去。因此, 研究中每个处理组中含有 8 只动物。

血液动力学测量:

在所有处理组之中, 冠状动脉闭塞引起心率和平均动脉压力略有下降。在实验期间的过程中三组动物在心率和平均动脉压力上未发现差异(表 1)。

危险面积、梗死尺寸和不复流现象的评价:

通过单星蓝在实验终点的注射所评价的由冠状动脉闭合产生的梗死危险面积在三个治疗组中相似(在对照、因子 VIIai 和因子 VIIa 处理过的动物中分别为左心室的 $31.6 \pm 6.3\%$, $28.2 \pm 4.1\%$ 和 $29.2 \pm 5.3\%$, $P=NS$)。

在冠状动脉闭塞 30 分钟后和再灌注 5.5 小时后, 对照组中向坏死发展的危险面积的值平均为 $59.8 \pm 12.8\%$ (图 7)。因子 VIIai 的施用将梗死尺寸明显减少到危险面积的 $28.1 \pm 11.3\%$, $P<0.01$, 使用 ANOVA(图 1), 而施用因子 VIIa 则与梗死尺寸明显增加到危险面积的 $80.1 \pm 13.1\%$ 相关 ($P<0.01$, 相对于对照和用因子 VIIai 处理过的兔, 图 7)。

在对照兔中, $24.4 \pm 2.7\%$ 的危险面积显示有灌注缺陷, 如在实验终止时用硫黄素 S 的分布所测定(不复流现象)。此不复流面积的范围分别由因子 VIIai 明显减少到危险面积的 $11.1 \pm 6.1\%$, 由因子 VII 明显增加到危险面积的 $61.9 \pm 13.8\%$ ($P<0.01$, 图 8)。

前面的研究表明: 在缺血后再灌注过程中显示有灌注缺陷的心肌组织的量与多种参数相关; 最重要的为危险面积的范围, 梗死尺寸的大小及在闭塞过程中残余伴随血流的量。这些变量的控制使得对不复流现象的干预作用有更为精确的评价。在本研究中, 将对照兔中不复流面积与这些参数相关联时, 观察到有密切关系, 其符合一元线性回归方程:

$$NR(\text{占左心室(LV)的}\%) = -14.62 + 0.75(AR) + 0.07(IS) + 3.69(RMBF);$$

$$R^2 = 0.98; \quad F \text{ 检验} = 109.3, (0.37)(0.3)(3.69),$$

其中 NR 为不复流面积, AR 为危险面积, RMBF 为伴随血流(ml/min/g)。括号内的数字显示相关系数的标准误差。 r^2 值为 0.98 的此模型归因于本研究观察的对照动物中 >95% 的不复流面积变量。

获自对照兔数据的多元线性回归方程中的方程相关系数用于计算每干预组中单个动物的预期不复流面积(图 9)。接受因子 VIIai 的兔子中实际观察到的不复流的面积比应用获自多元回归分析的方程计算的预期值小。实际上, 在用因子 VIIai 处理过的兔中, 任何实际观察值小于其给定的预期不复流面积, 即: 此组中全部动物的值分布在获自对照动物的回归线下方(图 9)。相反, 用因子 VIIa 处理过的兔有正相反的显示, 即: 对于

任何给定的预期不复流面积, 实际观察值明显更大, 此组中动物分布在对照动物的回归线上(图 9)。综上, 这些数据显示在因子 VIIai 处理过的动物中观察到的不复流现象的减少不完全是梗死面积减少造成的, 这提示在缺血后再灌注过程中外源性凝血级联反应的激活对不复流现象的发生有作用。

局部心肌血流的测量:

在对照动物中, 贯穿研究中的非缺血性心肌的 RMBF 平均为 1.20ml/min/克组织(数据未给出)。在同一组动物中, 对缺血性心肌的 RMBF 在冠状动脉闭塞后 20 分钟、灌注后 10 分钟及 5 小时分别为 0.08 ± 0.02 , 1.43 ± 0.28 和 0.98 ± 0.19 ml/min/克组织。与对照动物相比本研究中所用的不同药物在实验期间并不明显改变无论是正常心肌还是在缺血性心肌中的 RMBF(图 10)。

凝血研究:

为了研究因子 VIIai 可能的系统性作用(可以诱发出血危险的增加), 测量在第 30 分钟的 CFV 收集的及在因子 VIIa 和因子 VIIai 施用后收集的血液样品中的 PT 和 aPTT。在 30 分钟 CFV 期终止时, PT 和 aPTT 平均分别为 8.2 ± 0.6 秒和 25 ± 3 秒。在因子 VIIai 施用后观察到 PT 略微增加到 10.1 ± 0.6 秒(图 11)。然而, 这种增加, 没有达到统计学上的显著性(使用 ANOVA)及带有 Bonferronis 修正的学生 t - 检验, $P=0.09$)。在因子 VIIai 施用后 aPTT 无明显改变(图 10)。仅就因子 VIIai 施用后所获的值而言, 因子 VIIa 的施用导致 PT 和 aPTT 的明显缩短(图 11)。

表 1:
冠状动脉闭塞-再灌注过程中的血液动力学变量

心率 (b/min)					
闭塞后的时间	对照	SQ29548	咪唑乙氧基甲酸	R68070	ASA
0	175 ± 5	170 ± 4	178 ± 6	169 ± 5	1
30分钟	169 ± 4	165 ± 5	173 ± 5	164 ± 6	1
1小时	169 ± 6	167 ± 4	171 ± 5	166 ± 5	1
2小时	173 ± 5	172 ± 5	175 ± 6	170 ± 5	1
3小时	170 ± 4	168 ± 5	177 ± 5	168 ± 6	1
4小时	175 ± 5	168 ± 6	174 ± 5	169 ± 5	1
5小时	175 ± 5	172 ± 2	173 ± 5	172 ± 6	1
6小时	168 ± 5	170 ± 4	174 ± 5	168 ± 5	1

平均动脉压力 (mm Hg)					
闭塞后的时间	对照	SQ29548	咪唑乙氧基甲酸	R68070	ASA+R68070
0	75 ± 4	78 ± 3	78 ± 4	73 ± 3	7
30分钟	69 ± 4	65 ± 4	71 ± 3	67 ± 4	6
1小时	69 ± 3	67 ± 4	71 ± 4	69 ± 4	6
2小时	73 ± 4	75 ± 4	75 ± 5	72 ± 4	7
3小时	74 ± 4	75 ± 3	77 ± 5	75 ± 3	7
4小时	75 ± 5	78 ± 4	76 ± 4	73 ± 4	7
5小时	73 ± 4	74 ± 5	78 ± 5	72 ± 4	7
6小时	73 ± 5	76 ± 4	74 ± 5	73 ± 5	7

表 2 冠状动脉闭塞及再灌注过程中局部心肌血流(ml/min/克组织)

	对照	FVIIai	FVIIa
正常心肌			
20 分钟 CAO	1.19 ± 0.22	1.03 ± 0.19	1.27 ± 0.24
10 分钟 REP	1.22 ± 0.15	1.10 ± 0.17	1.19 ± 0.20
2 小时 REP	1.17 ± 0.18	1.07 ± 0.16	1.22 ± 0.19
缺血性心肌			
20 分钟 CAO	0.09 ± 0.05	0.08 ± 0.05	0.08 ± 0.04
10 分钟 REP	1.53 ± 0.12	1.65 ± 0.18	1.24 ± 0.14
2 小时 REP	0.89 ± 0.14	1.23 ± 0.15	0.72 ± 0.13

CAO = 冠状动脉闭塞; REP = 再灌注

实施例 XIX 因子 VIIai 的应用减少梗死尺寸及梗死的危险面积

在冠状动脉血管系统中发生在缺血后心肌再灌注过程中的组织因子暴露导致冠状动脉中血流的下降。

为鉴定组织因子暴露是否通过对凝血的活化及减少缺血后再灌注过程中冠状动脉血流来对心肌损伤有作用,将新西兰白兔先经过 30 分钟冠状动脉闭塞后再经过 5.5 小时的再灌注。再灌注时,动物随机的接受:盐水(n=8);人重组活性位点封闭的因子 VIIa(因子 VIIai, 100 μg/kg/min 注入左心房 10 分钟, n=8)或人重组活化的因子 VIIa(因子 VIIa 100 μg/kg/min 注入左心房 10 分钟, n=8)。用彩色微球在缺血 20 分钟及再灌注 10 分钟和 2 小时后测量局部心肌血流(RMBF)。在实验终止时通过单星蓝和硫黄素的分布以及通过 TTC 染色测定梗死危险面积(AR),梗死尺寸(IS)和不复流面积(NR)。与对照相比,因子 VIIa 导致 IS 和 NR 的明显减少(分别为 AR 值的 28.1 ± 11.3%和 11.1 ± 6.1%,对应 AR 值的 59.8 ± 12.8%和 24.4 ± 8.2% P<0.01),而与对照相比,因子 VIIa 导致在 IS 和 NR 上

的显著增加, 分别为 AR 的 $80.1 \pm 13.1\%$ 和 $61.9 \pm 13.8\%$ ($P < 0.01$)。在
各组中血压、心率、AR 及缺血 20 分钟的 RMBF 均未观察到差异。在因
子 VIIai 处理过的动物中再灌注 2 小时时 RMBF 明显要高, 而在因子 VIIa
处理过的兔中较低。因此, 由 TF 介导的凝血活性对在缺血后再灌注过程
中发生的心肌损伤有重要贡献。

	因子 VIIai(AR)	对照(AR)	因子 VIIa(AR)
IS	28.1 ± 11.3	59.8 ± 12.8	80.1 ± 13.1
NR	11.1 ± 6.1	24.4 ± 8.2	61.9 ± 13.8

AR = 梗死危险面积; IS = 梗死尺寸(IS); NR = 不复流面积

虽然上述发明已用阐明的方式和意在澄清理解的实施例进行了某种
程度的详述, 显然地, 可以在附属的权利要求范围之内进行特定的改变和
修饰。

序列表

(1)一般信息:

(i) 申请人: **Zymo Genetics 和 Novo Nordisk A/S**

(ii) 发明名称: **修饰过的因子 VII**

(iii) 序列数目: **4**

(iv) 相关地址:

(A) 收信人: **Novo Nordisk A/S, 共同专利**

(B) 街道: **Novo Alle**

(C) 城市: **DK - 2880 Bagsvaerd**

(D) 国家: **丹麦**

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: **软盘**

(B) 计算机: **IBM PC 兼容机**

(C) 操作系统: **PC - DOS/MS - DOS**

(D) 软件: **PatentIn Release #1.24**

(vi) 当前申请数据:

(A) 申请号:

(B) 递交日:

(C) 分类,

(vii) 在先申请数据:

(A) 申请号: **08/475,845**

(B) 递交日: **1995 年 6 月 7 日**

(C) 分类:

(2) SEQ ID 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: **2422 碱基对**

(B) 类型: **核酸**

(C) 链型: **单链**

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 28..1420

(D) 其它信息:密码子起始=28

产物=因子 VII

(xi) SEQ ID 1 的序列描述:

```
CCTCCCGACA ATACAGGGGC AGCACTGCAG AGATTTCATC ATG GTC TCC CAG GCC 55
                                     Met Val Ser Gln Ala
                                     -38          -35
```

```
CTC AGG CTC CTC TGC CTT CTG CTT GGG CTT CAG GGC TGC CTG GCT GCA 103
Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala
          -30          -25          -20
```

```
GTC TTC GTA ACC CAG GAG GAA GCC CAC GGC GTC CTG CAC CGG CGC CGG 151
Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg
          -15          -10          -5
```

```
CGC GCC AAC GCG TTC CTG GAG GAG CTG CGG CCG GGC TCC CTG GAG AGG 199
Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg
      1              5              10              15
```

GAG TGC AAG GAG GAG CAG TGC TCC TTC GAG GAG GCC CGG GAG ATC TTC	247
Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe	
20 25 30	
AAG GAC GCG GAG AGG ACG AAG CTG TTC TGG ATT TCT TAC AGT GAT GGG	295
Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly	
35 40 45	
GAC CAG TGT GCC TCA AGT CCA TGC CAG AAT GGG GGC TCC TGC AAG GAC	343
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp	
50 55 60	
CAG CTC CAG TCC TAT ATC TGC TTC TGC CTC CCT GCC TTC GAG GGC CGG	391
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg	
65 70 75	
AAC TGT GAG ACG CAC AAG GAT GAC CAG CTG ATC TGT GTG AAC GAG AAC	439
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn	
80 85 90 95	
GGC GGC TGT GAG CAG TAC TGC AGT GAC CAC ACG GGC ACC AAG CGC TCC	487
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser	
100 105 110	
TGT CGG TGC CAC GAG GGG TAC TCT CTG CTG GCA GAC GGG GTG TCC TGC	535
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys	
115 120 125	
ACA CCC ACA GTT GAA TAT CCA TGT GGA AAA ATA CCT ATT CTA GAA AAA	583
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys	
130 135 140	

AGA AAT GCC AGC AAA CCC CAA GGC CGA ATT GTG GGG GGC AAG GTG TGC	631
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys	
145 150 155	
CCC AAA GGG GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG TTG GTG AAT GGA GCT	679
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala	
160 165 170 175	
CAG TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC TGG GTG GTC TCC GCG	727
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala	
180 185 190	
GCC CAC TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG AAC CTG ATC GCG GTG	775
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val	
195 200 205	
CTG GGC GAG CAC GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG GAT GAG CAG AGC CGG	823
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg	
210 215 220	
CGG GTG GCG CAG GTC ATC ATC CCC AGC ACG TAC GTC CCG GGC ACC ACC	871
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr	
225 230 235	
AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC CTG CAC CAG CCC GTG GTC CTC ACT	919
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr	
240 245 250 255	
GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA CGG ACG TTC TCT GAG AGG	967
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg	
260 265 270	

ACG CTG GCC TTC GTG CGC TTC TCA TTG GTC AGC GGC TGG GGC CAG CTG	1015
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu	
275 280 285	
CTG GAC CGT GGC GCC ACG GCC CTG GAG CTC ATG GTC CTC AAC GTG CCC	1063
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro	
290 295 300	
CGG CTG ATG ACC CAG GAC TGC CTG CAG CAG TCA CGG AAG GTG GGA GAC	1111
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp	
305 310 315	
TCC CCA AAT ATC ACG GAG TAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC TCG GAT GGC	1159
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly	
320 325 330 335	
AGC AAG GAC TCC TGC AAG GGG GAC AGT GGA GGC CCA CAT GCC ACC CAC	1207
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His	
340 345 350	
TAC CGG GGC ACG TGG TAC CTG ACG GGC ATC GTC AGC TGG GGC CAG GGC	1255
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly	
355 360 365	
TGC GCA ACC GTG GGC CAC TTT GGG GTG TAC ACC AGG GTC TCC CAG TAC	1303
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr	
370 375 380	
ATC GAG TGG CTG CAA AAG CTC ATG CGC TCA GAG CCA CGC CCA GGA GTC	1351
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val	
385 390 395	
CTC CTG CGA GCC CCA TTT CCC TAG C CCAGCAGCCC TGGCCTGTGG	1396
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro	
400 405	

AGAGAAAGCC AAGGCTGCGT CGAACTGTCC TGGCACCAAA TCCCATATAT TCTTCTGCAG 1456
 TTAATGGGGT AGAGGAGGGC ATGGGAGGGA GGGAGAGGTG GGGAGGGAGA CAGAGACAGA 1516
 AACAGAGAGA GACAGAGACA GAGAGAGACT GAGGGAGAGA CTCTGAGGAC ATGGAGAGAG 1576
 ACTCAAAGAG ACTCCAAGAT TCAAAGAGAC TAATAGAGAC ACAGAGATGG AATAGAAAAG 1636
 ATGAGAGGCA GAGGCAGACA GCGCTGGAC AGAGGGGCAG GGGAGTGCCA AGGTTGTCCT 1696
 GGAGGCAGAC AGCCCAGCTG AGCCTCCTTA CCTCCCTTCA GCCAAGCCCC ACCTGCACGT 1756
 GATCTGCTGG CCCTCAGGCT GCTGCTCTGC CTTCAATTGCT GGAGACAGTA GAGGCATGAA 1816
 CACACATGGA TGCACACACA CACACGCCAA TGCACACACA CAGAGATATG CACACACACG 1876
 GATGCACACA CAGATGGTCA CACAGAGATA CGCAAACACA CCGATGCACA CGCACATAGA 1936
 GATATGCACA CACAGATGCA CACACAGATA TACACATGGA TGCACGCACA TGCCAATGCA 1996
 CGCACACATC AGTGCACACG GATGCACAGA GATATGCACA CACCGATGTG CGCACACACA 2056
 GATATGCACA CACATGGATG AGCACACACA CACCAAGTGC GCACACACAC CGATGTACAC 2116
 ACACAGATGC ACACACAGAT GCACACACAC CGATGCTGAC TCCATGTGTG CTGTCCTCTG 2176
 AAGGCGGTTG TTTAGCTCTC ACTTTTCTGG TTCTTATCCA TTATCATCTT CACTTCAGAC 2236
 AATTCAGAAG CATCACCATG CATGGTGGCG AATGCCCCCA AACTCTCCCC CAAATGTATT 2296
 TCTCCCTTCG CTGGGTGCCG GGCTGCACAG ACTATTCCCC ACCTGCTTCC CAGCTTCACA 2356
 ATAAACGGCT GCGTCTCCTC CGCACACCTG TGGTGCCTGC CACCCAAAAA AAAAAAAAAA 2416
 AAAAAA 2422

(2) SEQ ID 2 的信息:**(i) 序列特征:****(A) 长度: 444 氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(D) 拓扑结构: 线性****(ii) 分子类型: 蛋白质****(xi) SEQ ID 2 的序列描述:**

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Trp Leu Leu Leu Gly Leu Gln
-38          -35          -30          -25

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
      -20          -15          -10

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
      -5          1          5          10

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
          15          20          25

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
          30          35          40

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
          45          50          55

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
          60          65          70

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
          75          80          85          90

```

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
 95 100 105

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
 110 115 120

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
 125 130 135

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
 140 145 150

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
 155 160 165 170

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 175 180 185

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 190 195 200

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 205 210 215

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 220 225 230

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 235 240 245 250

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
255 260 265

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
270 275 280

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
285 290 295

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
300 305 310

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
315 320 325 330

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
335 340 345

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
350 355 360

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
365 370 375

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
380 385 390

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
395 400 405

(2) SEQ ID 3 的信息:**(i) 序列特征:****(A) 长度: 21 碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 单链****(D) 拓扑结构: 线性****(ii) 分子类型: cDNA****(iii) 假设: 否****(iv) 反义: 否****(xi) SEQ ID 3 的序列描述:**

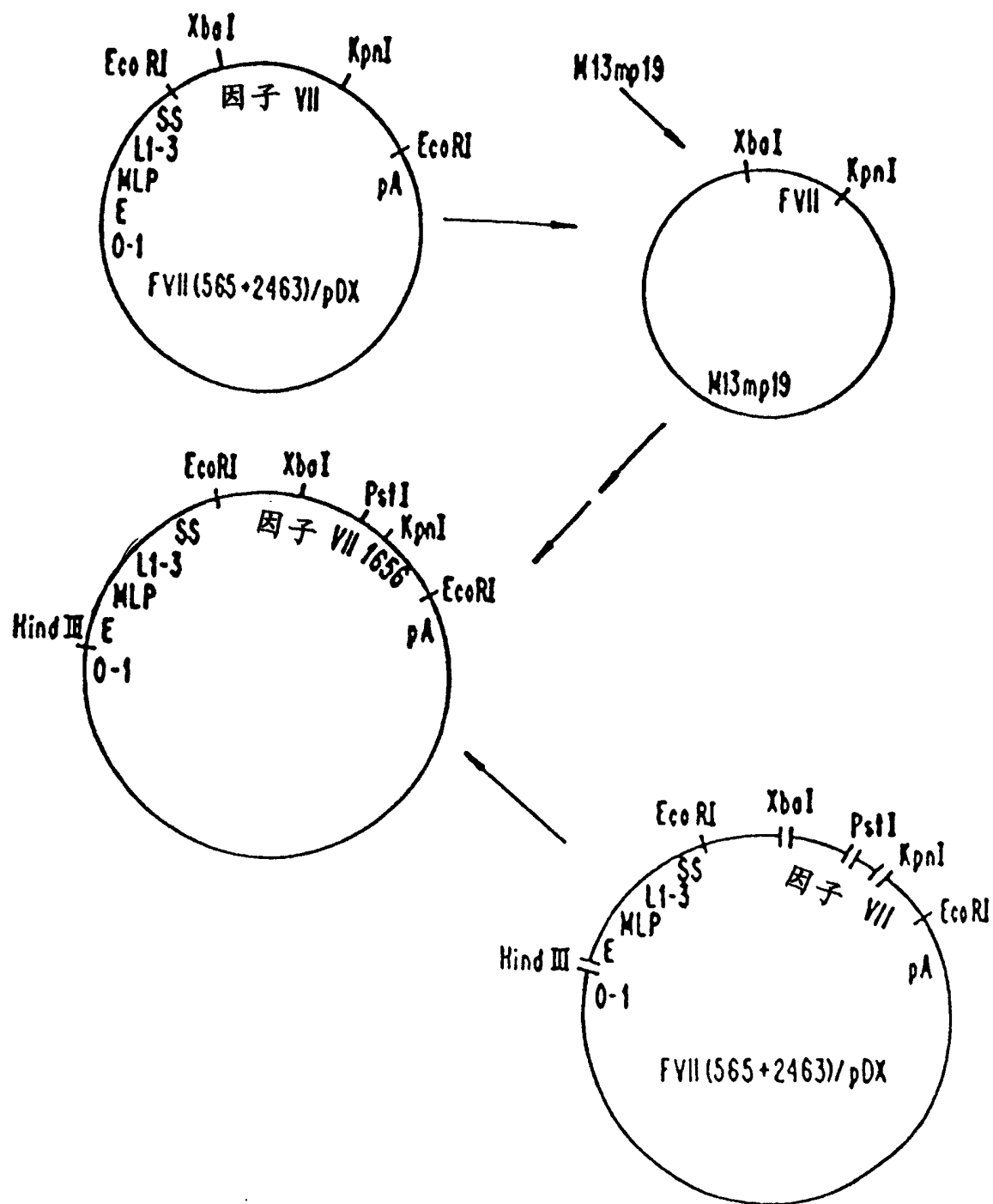
TGGGCCTCCG GCGTCCCCCT T 21

(2) SEQ ID 4 的信息:**(i) 序列特征:****(A) 长度: 15 碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 单链****(D) 拓扑结构: 线性****(ii) 分子类型: cDNA****(iii) 假设: 否****(iv) 反义: 否****(xi) SEQ ID 4 的序列描述:**

TCCCAGTCAC GACGT 15

1/11

图 1



2/11

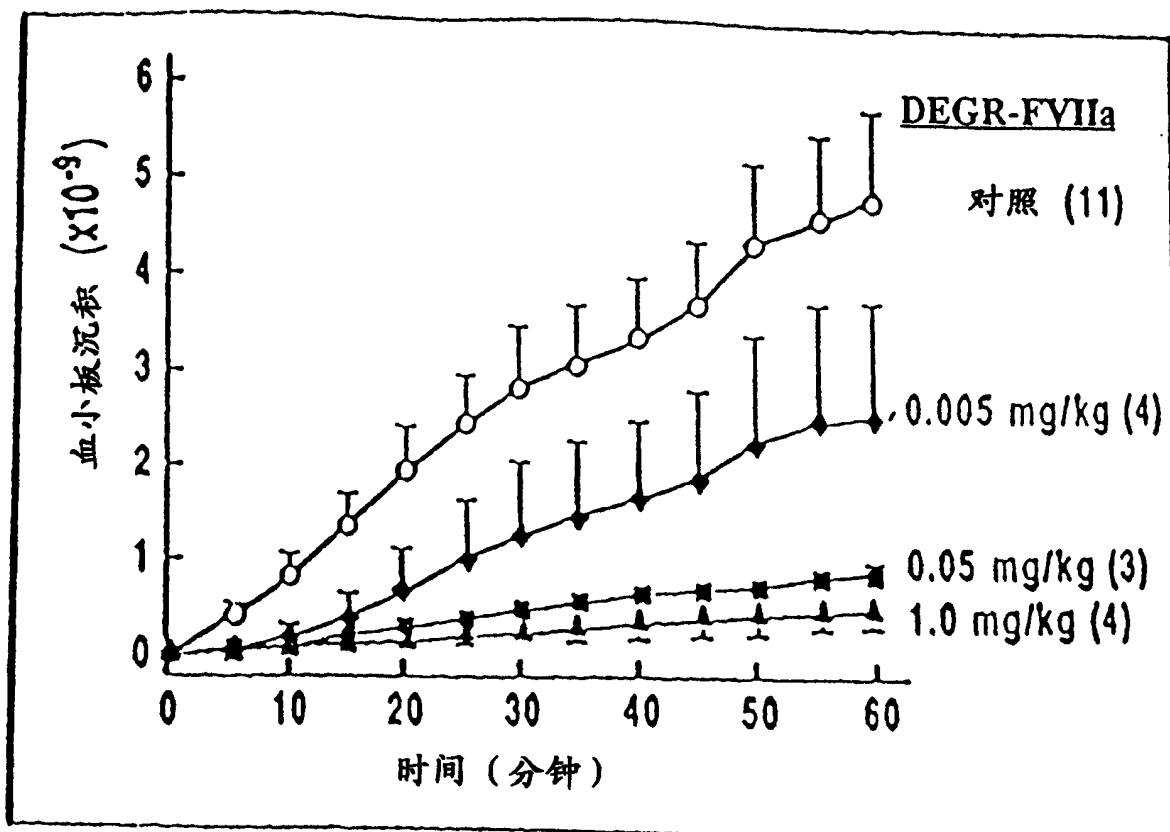
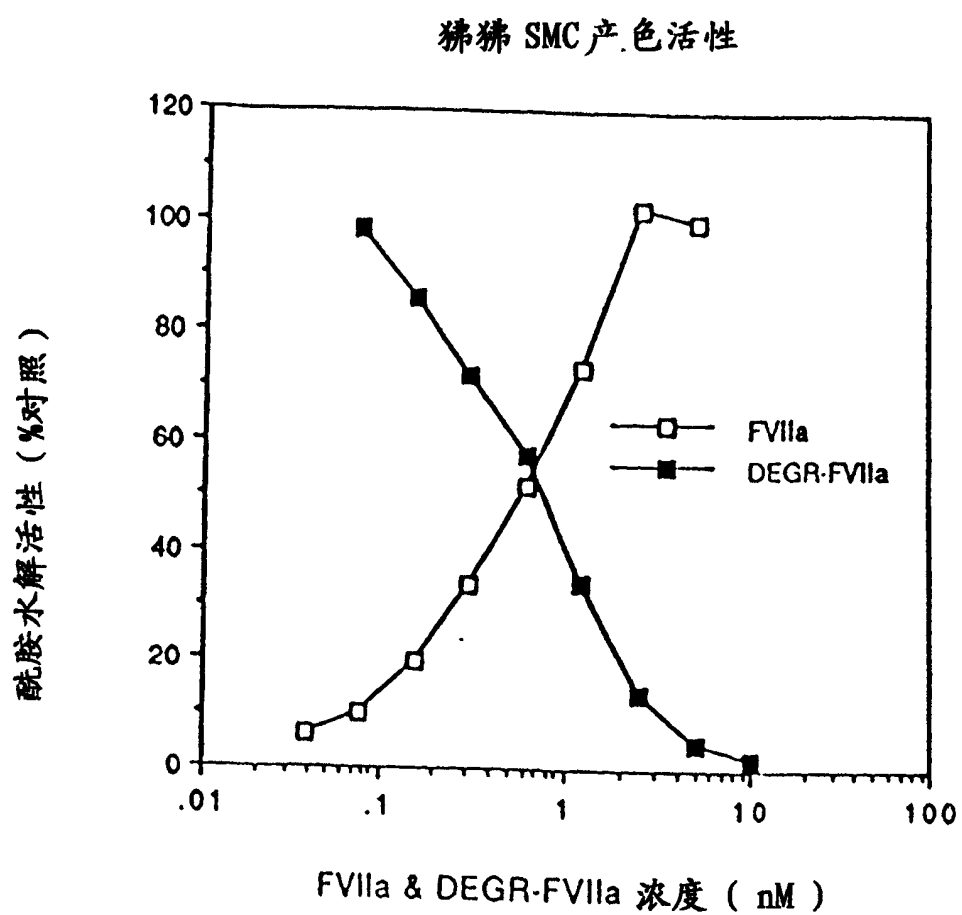


图 2

3/11

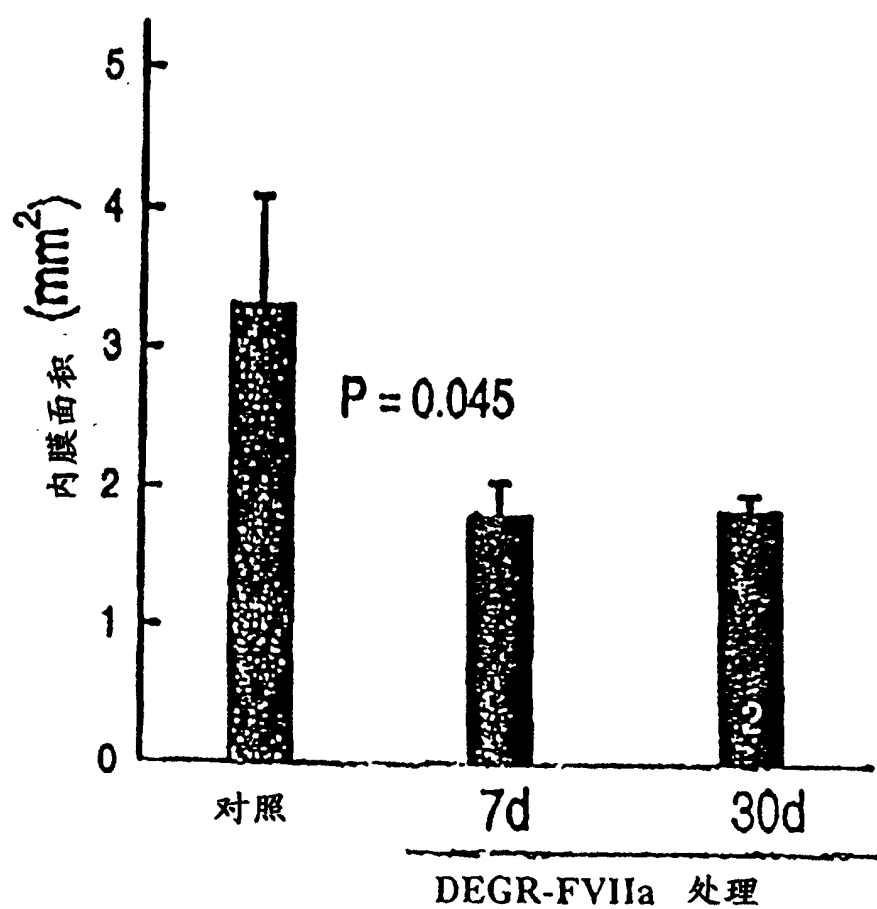
图 3



4/11

图 4

颈动脉内膜切除术



5/11

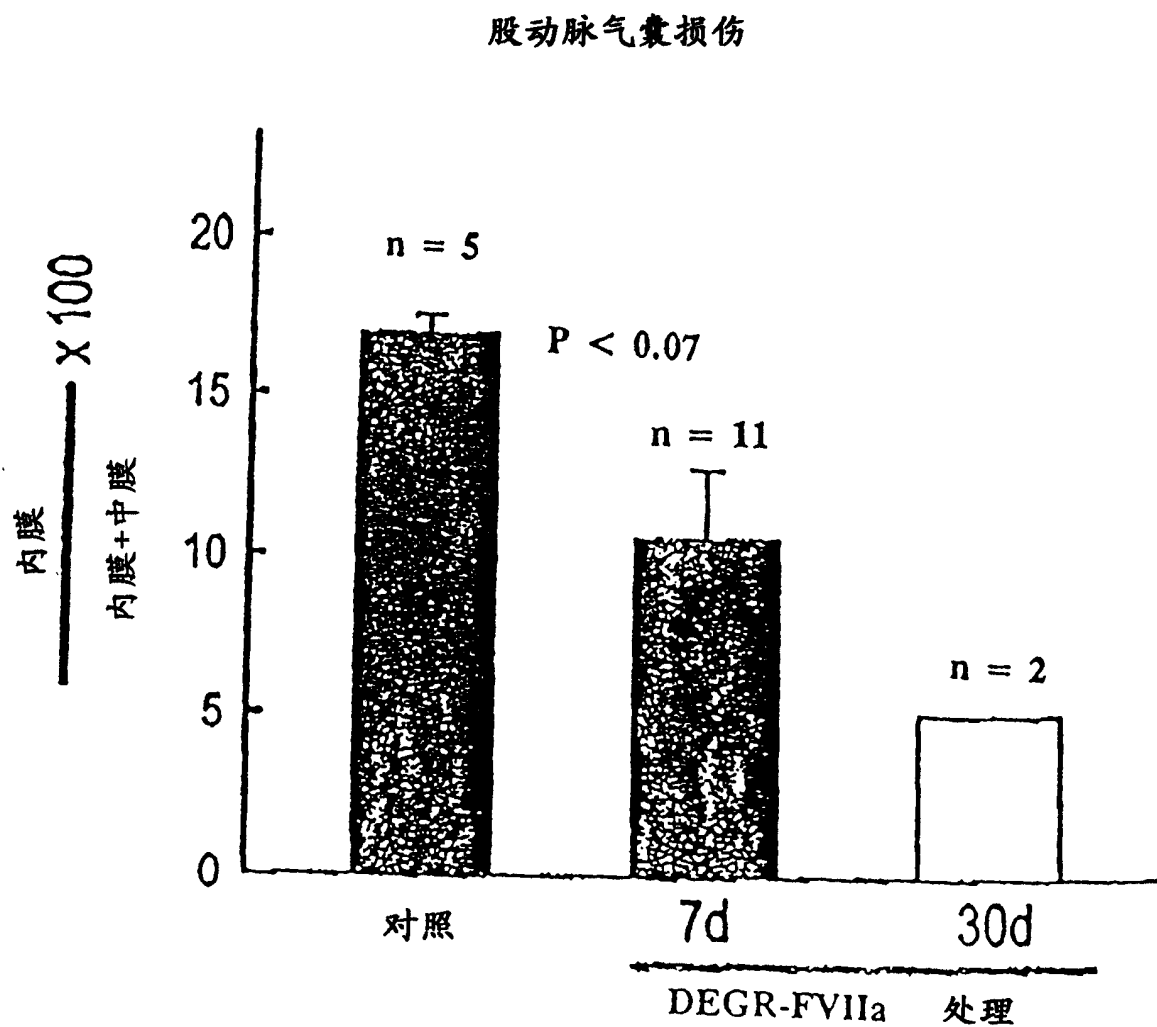


图 5

实验方案

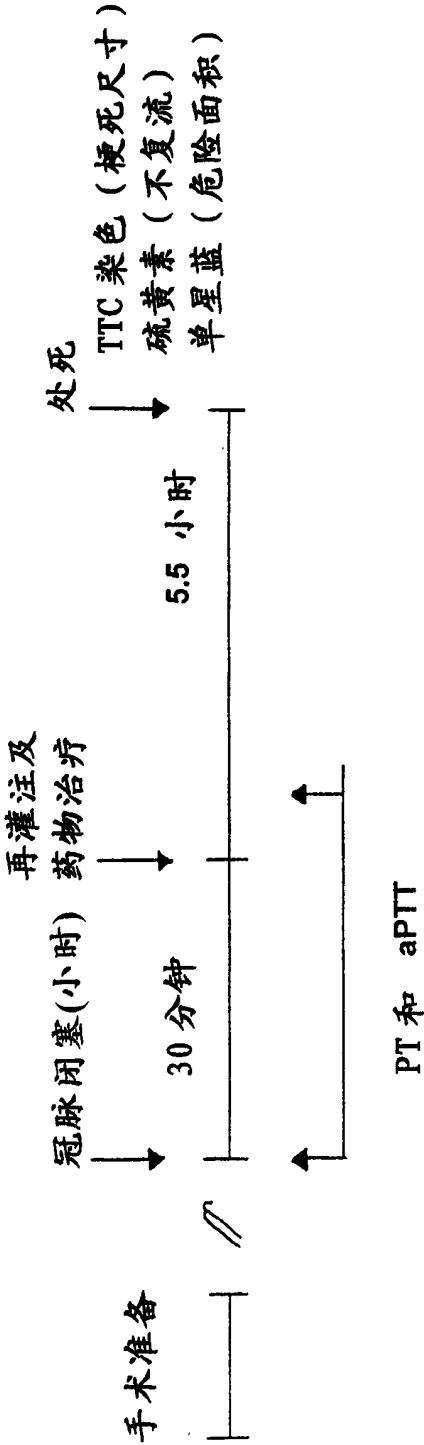


图 6

7/11

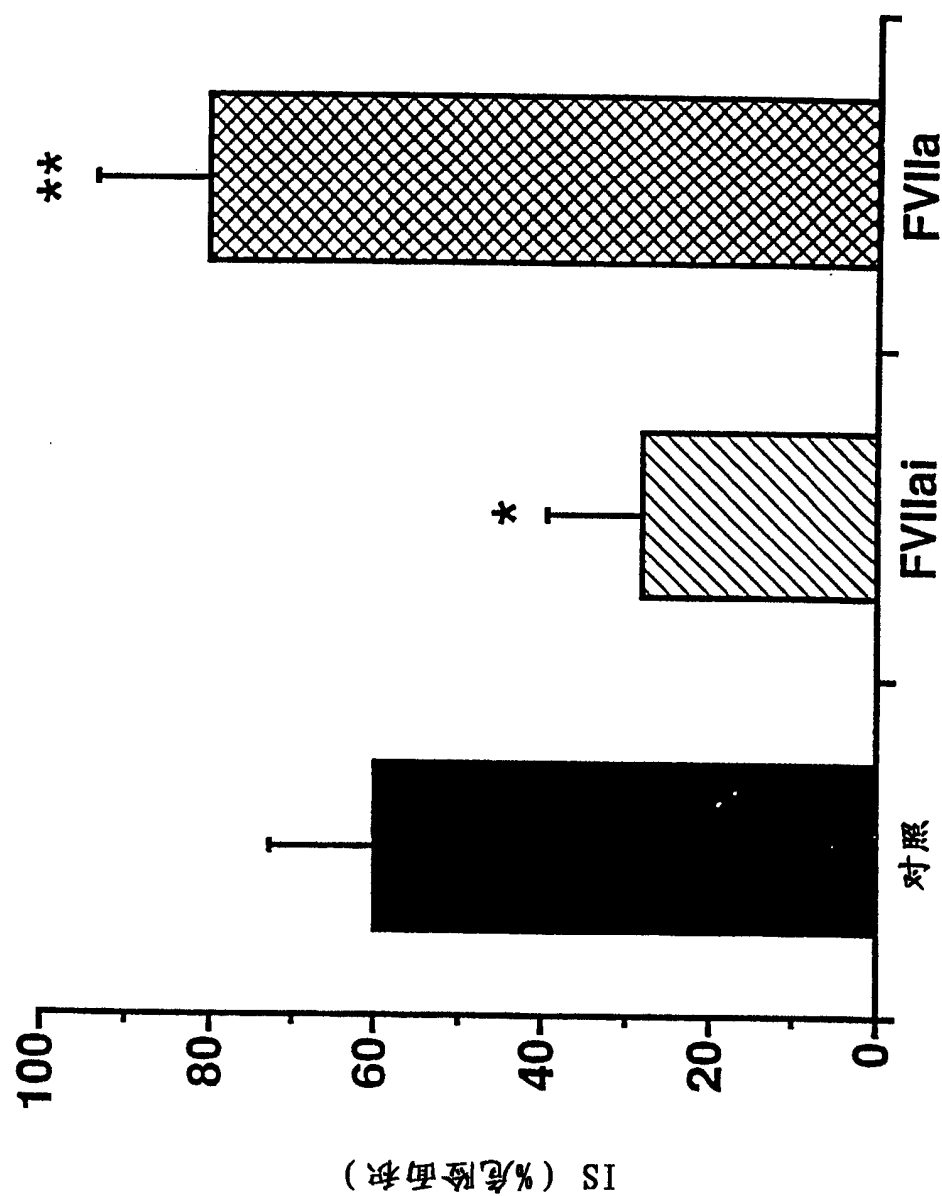


图 7

8/11

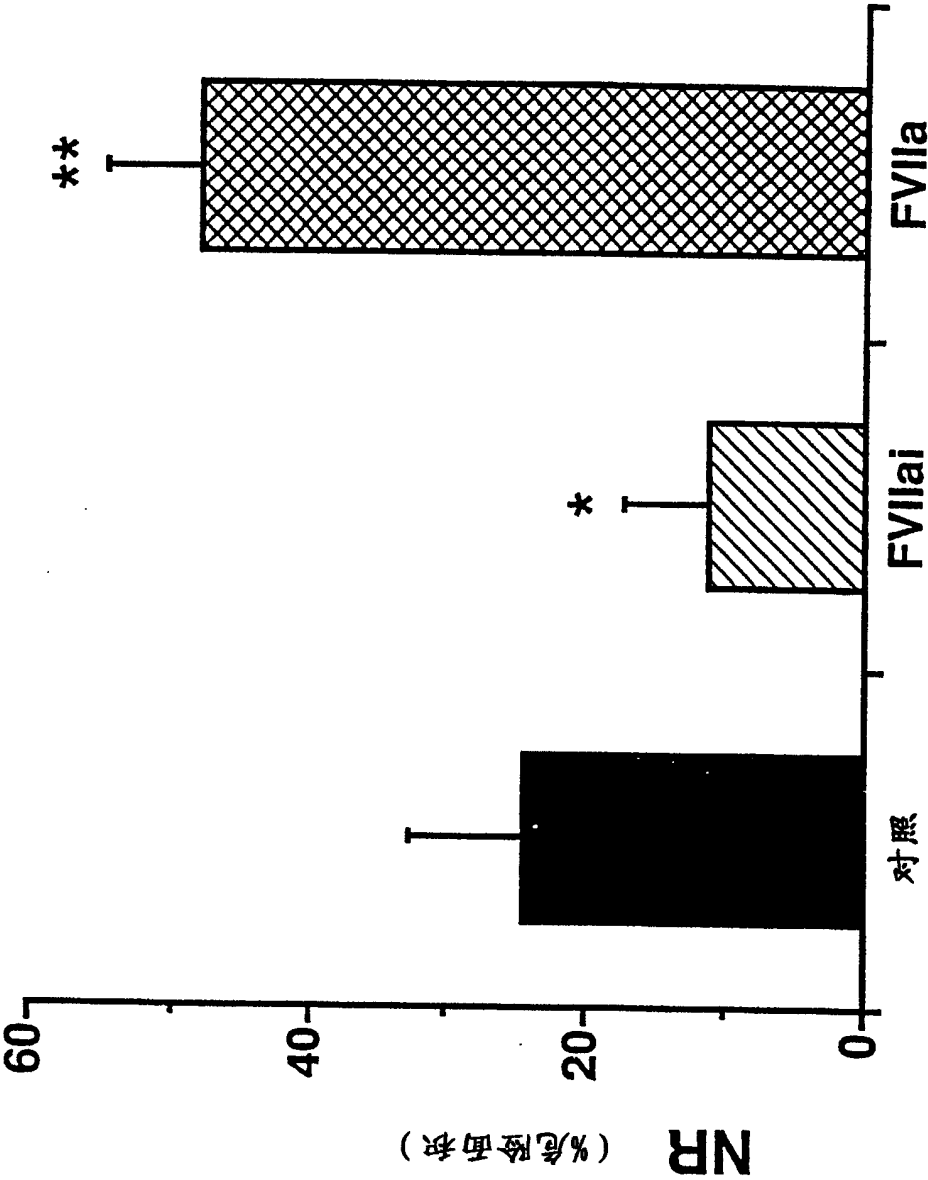


图 8

9/11

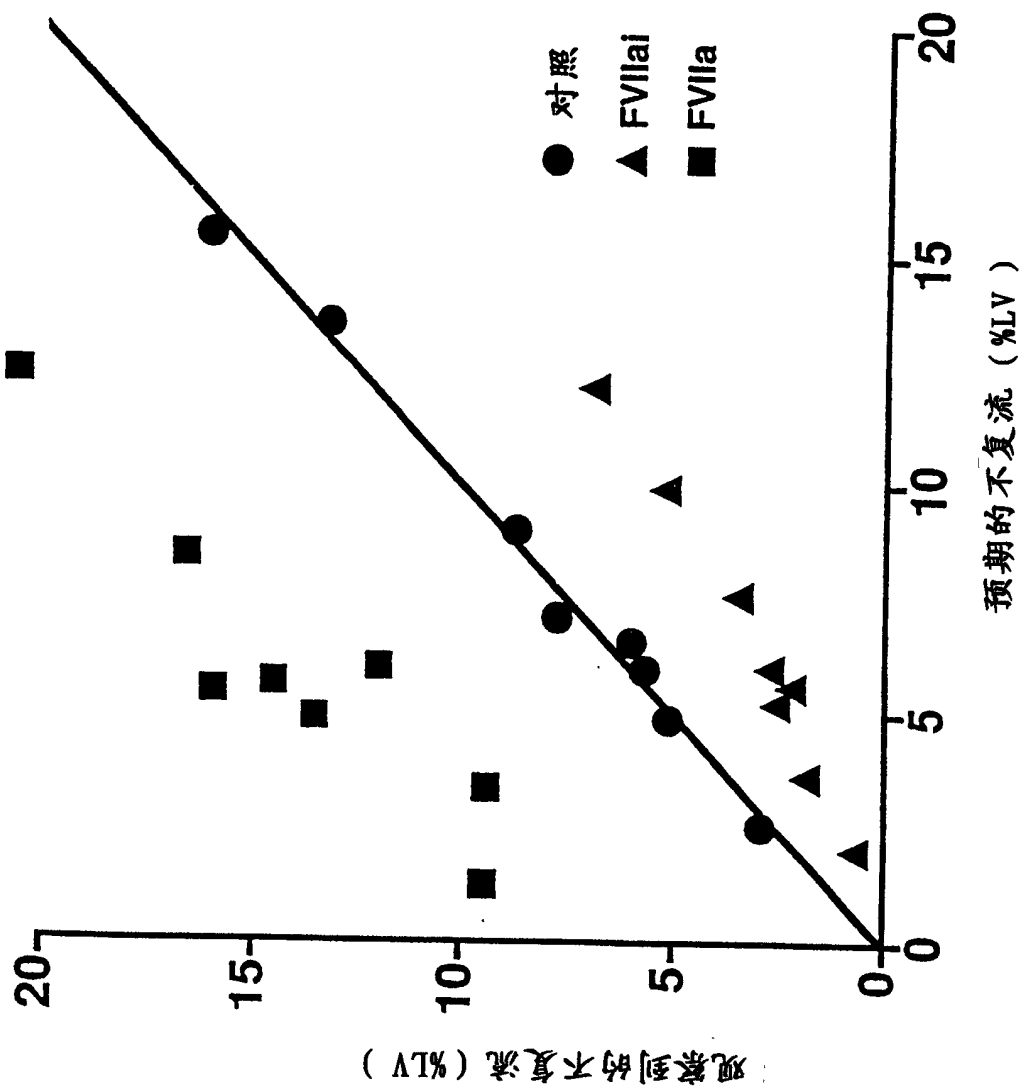


图 9

10/11

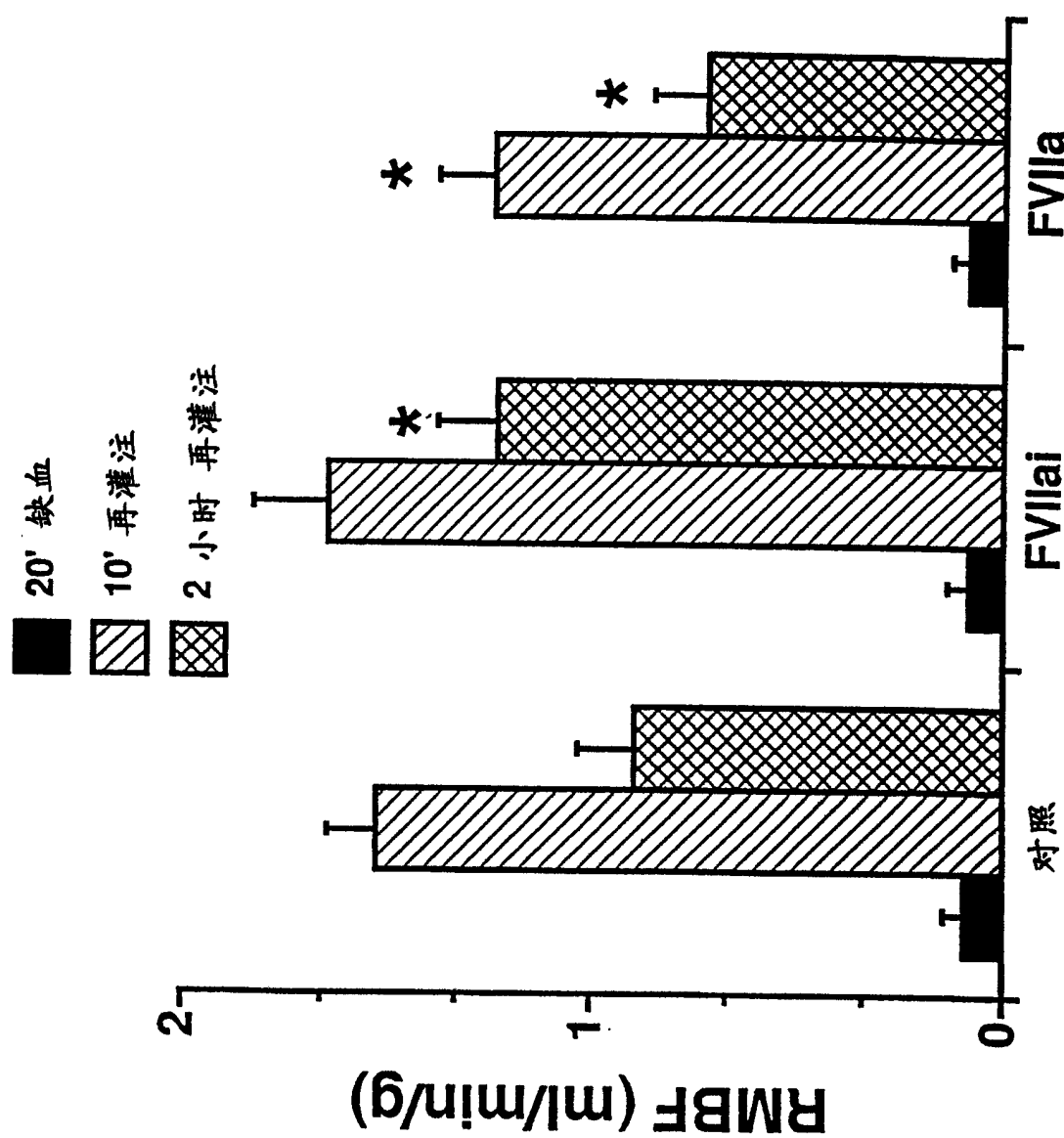


图 10

11/11

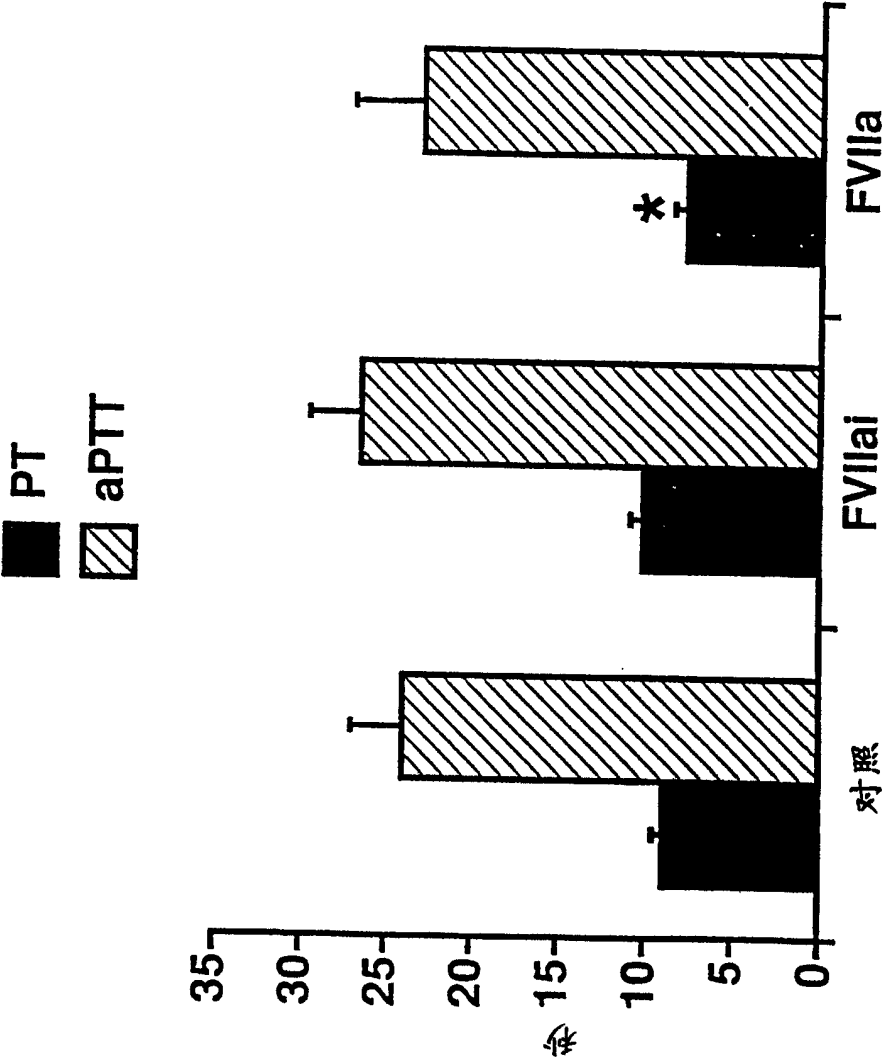


图 11