



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113423465 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 06

(21) 申请号 201980090647.9

M·瓦利施 C·U·洛伦茨

(22) 申请日 2019.11.27

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理

(65) 同一申请的已公布的文献号

事务所(普通合伙) 11436

申请公布号 CN 113423465 A

专利代理师 程淼

(43) 申请公布日 2021.09.21

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/36 (2006.01)

62/772,235 2018.11.28 US

C07K 19/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/13 (2006.01)

2021.07.28

G01N 33/577 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/68 (2006.01)

PCT/US2019/063729 2019.11.27

A61K 39/395 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 7/02 (2006.01)

W02020/113084 EN 2020.06.04

A61P 29/00 (2006.01)

(73) 专利权人 俄勒冈健康与科学大学

(56) 对比文件

地址 美国俄勒冈州

CN 101102819 A, 2008.01.09

专利权人 阿罗诺拉股份有限公司

US 2015315292 A1, 2015.11.05

(72) 发明人 A·格鲁伯 E·I·塔克

审查员 蒋红云

权利要求书3页 说明书55页

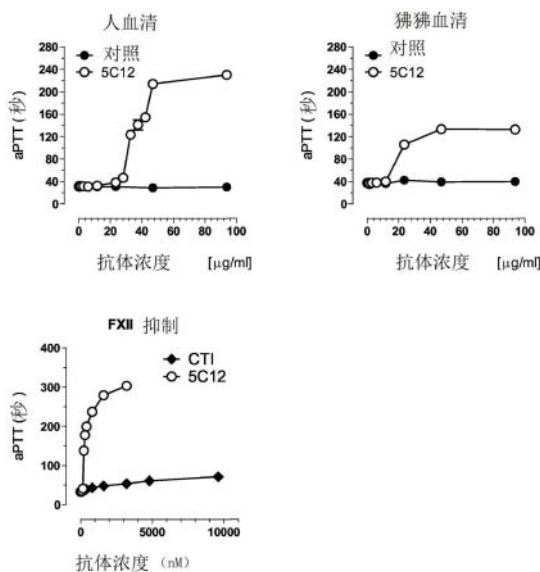
序列表19页 附图40页

(54) 发明名称

治疗性的因子XII抗体

(57) 摘要

描述了与血液蛋白因子XII (FXII) 结合 (例如特异性结合) 的单克隆抗体。该单克隆抗体 (包括其抗原结合片段) 能够与人 (FXII) 形成免疫复合物并抑制 (FXII) 活性, 从而产生安全的抗炎和抗血栓作用。



1. 一种结合血液蛋白因子XII (FXII) 的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括可变重(VH) 结构域和可变轻(VL) 结构域,其中:

所述VH结构域包括SEQ ID NO: 2的互补决定区1 (CDR1)、CDR2和CDR3序列,所述VH结构域CDR1、CDR2和CDR3序列分别如SEQ ID NO: 2的残基26-34、52-58和97-104所示;和

所述VL结构域包括SEQ ID NO: 4的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中所述VL结构域CDR1、CDR2和CDR3序列分别如SEQ ID NO: 4的残基27-31、49-51和88-96所示。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或抗原结合片段,其中:

所述VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16至少90%一致;和

所述VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 20至少90%一致。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段,其中:

所述VH结构域的氨基酸序列包括SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16;和

所述VL结构域的氨基酸序列包括SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 20。

4. 根据权利要求3所述的单克隆抗体或抗原结合片段,其中所述VH结构域的氨基酸序列包括SEQ ID NO:8,并且所述VL结构域的氨基酸序列包括SEQ ID NO:10。

5. 根据权利要求1-2中任一项所述的单克隆抗体,包括重链和轻链,其中:

所述重链的氨基酸序列与SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15至少90%一致;和

所述轻链的氨基酸序列与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 19至少90%一致。

6. 根据权利要求5所述的单克隆抗体,其中:

所述重链的氨基酸序列包括SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15;和

所述轻链的氨基酸序列包括SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 19。

7. 根据权利要求5所述的单克隆抗体,其中所述重链的氨基酸序列包括SEQ ID NO:7,并且所述轻链的氨基酸序列包括SEQ ID NO: 9。

8. 根据权利要求1-2中任一项所述的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab' 片段、F(ab)'<sub>2</sub>片段、单链可变片段(scFv) 或二硫化物稳定的可变片段(dsFv)。

9. 根据权利要求1-2中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段,其为人源化抗体或抗原结合片段。

10. 一种融合蛋白,包括权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段和异源蛋白。

11. 一种抗体偶联物,包括权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段和可检测标签。

12. 根据权利要求11所述的抗体偶联物,其中所述可检测标签包括荧光团、酶或放射性

同位素。

13. 一种组合物,包括药学上可接受的载体和权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段。

14. 一种核酸分子,所述核酸分子编码权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段。

15. 根据权利要求14所述的核酸分子,包括SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和/或SEQ ID NO: 24的核苷酸序列。

16. 根据权利要求15所述的核酸分子,包括SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12或两者的核苷酸序列。

17. 根据权利要求14-16中任一项所述的核酸分子,所述核酸分子可操作地连接至启动子。

18. 一种载体,包括权利要求14-17中任一项所述的核酸分子。

19. 一种分离的细胞,包括权利要求14-17中任一项所述的核酸分子或权利要求18所述的载体。

20. 一种用于检测样品中的FXII的非诊断性方法,包括将所述样品与权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段接触;以及

检测所述抗体与所述样品的结合,从而检测所述样品中的FXII。

21. 根据权利要求20所述的非诊断性方法,其中所述单克隆抗体或抗原结合片段被直接标记。

22. 根据权利要求20所述的非诊断性方法,进一步包括:

将所述单克隆抗体或抗原结合片段与二级抗体接触,和

检测所述二级抗体与所述单克隆抗体或抗原结合片段的结合,从而检测所述样品中的FXII。

23. 一种抑制包含FXII的样品中FXII的活化和/或活性的体外方法,所述方法包括将样品与权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述样品包括血样。

25. 权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在受试者中治疗微血管血栓形成、大血管血栓形成、血栓栓塞或弥散性血管内凝血的药物中的用途。

26. 权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在受试者中治疗涉及FXII的活化和/或活化的FXII (FXIIa) 的活性的病理性高凝血的药物中的用途。

27. 权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在受试者中抑制涉及FXII的活化和/或FXIIa的活性的血栓形成的药物中的用途。

28. 根据权利要求26或权利要求27所述的用途,其中所述受试者患有或有风险发生细菌感染、真菌感染、病毒感染、寄生虫感染、缺血性器官疾病、微血管血栓形成、大血管血栓形成、血栓栓塞、弥散性血管内凝血、严重全身炎症反应综合征、涉及FXIIa活性的过敏或炎症反应、急性呼吸窘迫综合征、癌症、羊水栓塞、创伤、移植排斥、镰状细胞病、自身免疫性疾病中,或已接受医疗设备植入。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所述缺血性器官疾病是心肌梗死或缺血性中风。

30. 根据权利要求28所述的用途,其中所述癌症是非转移性实体瘤癌症、转移性实体瘤癌症或白血病。

31. 根据权利要求28所述的用途,其中所述医疗设备植入是植入导管、心脏瓣膜、支架或移植物。

32. 根据权利要求25-27中任一项所述的用途,进一步包括向所述受试者施用有效量的第二抗凝血治疗、或抗血栓或溶栓治疗。

33. 根据权利要求25-27中任一项所述的用途,其中通过肠外给药施用所述单克隆抗体或抗原结合片段。

34. 根据权利要求25-27中任一项所述的用途,其中以约0.1 mg/kg至约2 g/kg的剂量施用所述单克隆抗体或抗原结合片段。

35. 一种试剂盒,包括权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段、权利要求10所述的融合蛋白、权利要求11或权利要求12所述的抗体偶联物、权利要求13所述的组合物、权利要求14-17中任一项所述的核酸分子、权利要求18所述的载体、权利要求19所述的分离的细胞或其任何组合。

## 治疗性的因子XII抗体

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年11月28日提交的美国临时申请号62/772,235的权益,其在此以其全文形式被援引加入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及对血液蛋白因子XII (FXII) 具有特异性的有效治疗性抗体及其在医学治疗方法中的用途,包括血栓形成的治疗和止血处理。

### 背景技术

[0004] 接触血液的医疗设备,包括导管、支架、移植物、过滤器和体外器官支持系统(ECOS),即使是通过施用抗凝剂进行医学上的血栓预防,也经常导致与设备相关的热栓栓塞,因为现有的抗凝剂由于不良的出血副作用而没有以其最大有效剂量给药(Lavery et al., *Adv Drug Deliv Rev* 2017;112:2-11)。为了保持通畅,灌注设备需要预防性抗凝,这可能增加出血的发生率和/或严重程度。抑制血液的接触活化,包括FXII抑制,已被提出作为治疗性抗凝的安全替代方法(PCT公开号W0 2013/013423;Gruber and Hanson, *Blood* 2003;102:953-955;Yau et al., *Blood* 2014;123:2102-2107;Tillman and Gailani, *Semin Thromb Hemost* 2018;44:60-69)。体外膜肺氧合(ECMO)用于呼吸衰竭的短期处理;然而,与抗凝相关的出血降低了其益处(Oliver, *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2009;13:154-175;Murphy et al., *Transfus Med Rev* 2015;29:90-101;Barbaro et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:894-901)。ECOS系统,例如ECMO、心肺转流、左心室辅助装置(LVAD)、全人工心脏(TAH)或血液透析,具有几种促进接触和血小板活化的成分(Sniecinski and Chandler, *Anesth Analg* 2011;113:1319-1333)。

[0005] 在体内激活除FXII、血浆激肽释放酶(PK)或高分子量激肽原(HK)外的凝血因子导致凝血酶生成,并随后导致血小板活化和纤维蛋白形成以支持止血(Smith et al., *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015;50:326-336)。但是,血管腔内的病理性凝血也可能涉及FXII、PK和HK,并可能导致血管闭塞性血栓形成/血栓栓塞。血栓形成的药理学治疗或血栓预防是通过抗血栓形成剂(例如肝素)实现的,抗血栓形成剂可能导致出血,因为它们抑制关键的止血血浆蛋白,例如凝血酶或因子Xa(Abraham et al., *BMJ* 2015;350:h1857;Ruff et al., *Lancet* 2014;383:955-962)。因此,由于剂量限制性的抗凝血毒性,这些药物不能以其完全功效剂量给药,并且血栓形成的血管阻塞仍然是发达国家中死亡的主要原因。为了解决抗血栓形成安全性的问题,提出了抑制接触活化将是目前抗血栓形成治疗的更安全的替代方案(PCT公开号W0 2013/013423;Gruber and Hanson, *Blood* 2003;102:953-955)。工业界和学术界都在不断地努力开发抑制剂来接触活化复合物组分以提高抗凝的安全性(Tillman et al., *Blood Rev* 2018;32:433-448)。

[0006] 血浆接触活化复合物促进病理性血栓形成。它涉及FXI、血浆激肽释放酶(PK)和辅因子高分子量激肽原(HK),它们在血液暴露于带负电的表面后被激活,包括各种生物分子

和人工材料 (Schmaier, *Thromb Res* 2014;133:S41-S44; Schmaier, *J Thromb Haemost* 2016;14:28-39; Tillman and Gailani, *Semin Thromb Hemost* 2018;44:60-69)。FXII的血浆浓度为30-40 $\mu\text{g/ml}$  (375-500nM) (Hanson and Tucker, Chapter II.2.6-Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al., editor(s). *Biomaterials Science* (Third Edition). Academic Press; 2013. p. 551-557)。FXII (80kDa单链酶原) 在Arg353之后的表面催化裂解产生蛋白酶 $\alpha$ -FXIIa。 $\alpha$ -FXIIa在Arg334之后的裂解产生 $\beta$ -FXIIa, 其包含FXIIa催化结构域。 $\alpha$ -FXIIa激活FXI到FXIa, 最终导致凝血酶 (FIIa) 产生, 并导致FXII的相互活化。同时,  $\alpha$ -FXIIa激活酶原PK到 $\alpha$ -激肽释放酶, 其将另外的FXII转化为 $\alpha$ -FXIIa。 $\beta$ -FXIIa激活补体系统的组分, 并作为激肽释放酶-激肽系统的一部分切割辅因子HK以释放缓激肽, 其导致NO的产生以及补体和其它系统的激活, 例如肾素-血管紧张素系统 (Ivanov et al., *Curr Opin Hematol* 2017; 24:411-418)。因此, 接触活化启动血栓前、血管调节和促炎症过程 (Renné, *Semin Immunopathol* 2012;34:31-41)。

[0007] 在活化部分凝血活酶时间 (aPTT) 凝血试验中, 接触活化驱动凝血酶形成, 并且缺乏接触蛋白的哺乳动物的血浆或血液的aPTT延长 (Turi and Peerschke, *Am J Clin Pathol* 1986;85:43-49)。虽然遗传性FXI缺乏可能导致人类轻度出血性疾病 (血友病C), 但FXII、PK或HK缺乏是无症状的 (Tagariello et al., *Blood Transfus* 2017;15:557-561; Kitchens, *J Thromb Haemost* 2005;3:2607-2611; Renne et al., *Blood* 2012;120:4296-4303)。重要的是, 尽管这些蛋白在止血中起到了很小的作用, 甚至没有作用, 但在一些实验动物模型中, 这些蛋白似乎有助于血栓形成 (Renné et al., *J Exp Med* 2005;202:271-281; Kleinschnitz et al., *J Exp Med* 2006;203:513-518; Crosby et al., *Arter Thromb Vasc Biol* 2013;33:1670-1678)。在兔ECMO模型中, 使用抗FXIIa抗体3F7抑制FXIIa减少了膜肺氧合器筒 (cartridge) 内的纤维蛋白沉积, 由此从动物静脉中提取静脉血并使用滚压泵泵送通过装置, 而不会明显增加实验性损伤引起的出血 (Kenne and Renne, *Drug Discov Today* 2014;19:1459-1464; Larsson et al., *Sci Transl Med* 2014;6:222ra17; Worm et al., *Ann Transl Med* 2015;3:247)。

## 发明内容

[0008] 描述了结合 (例如特异性结合) 血液蛋白因子XII (FXII) 的单克隆抗体。该单克隆抗体 (包括其抗原结合片段) 能够与人FXII形成免疫复合物并抑制FXII活性, 从而产生抗炎和抗血栓形成作用。

[0009] 本文提供了结合至催化结构域并阻断FXII的催化活性的单克隆抗体或其抗原结合片段。该单克隆抗体或抗原结合片段包括可变重 (VH) 结构域和可变轻 (VL) 结构域。在一些实施方案中, 该单克隆抗体或抗原结合片段的VH结构域包括SEQ ID NO:2的互补决定区 (CDR) 序列, 和/或该单克隆抗体或抗原结合片段的VL结构域包括SEQ ID NO:4的CDR序列。

[0010] 还提供了如本文所公开的融合蛋白、抗体偶联物和包括FXII特异性单克隆抗体或其抗原结合片段的组合物。

[0011] 进一步提供了编码所公开的单克隆抗体或抗原结合片段的核酸分子和载体。还提供了包括本文公开的核酸分子或载体的分离的细胞。

[0012] 还提供了检测样品中的FXII的方法,通过使样品与本文公开的单克隆抗体或抗原结合片段接触并检测抗体与样品的结合来进行。

[0013] 进一步提供了抑制样品中的FXII的活化和/或活性(例如FXIIa的活性)的体外方法,通过使样品与本文公开的FXII特异性抗体或抗原结合片段接触来进行。

[0014] 还提供了抑制受试者中FXII的活化和/或活性的方法、治疗涉及受试者中FXII的活化和/或活性的病理性高凝血的方法、以及抑制涉及受试者中FXII的活化和/或活性的血栓形成或炎症的方法,通过向受试者施用有效量的本文公开的抗体或抗原结合片段来进行。在一些实例中,所述方法涉及抑制活化的FXII(FXIIa)的活性。

[0015] 本公开进一步提供了包括所公开的单克隆抗体、抗原结合片段、融合蛋白、抗体偶联物、组合物、核酸分子、载体或分离的细胞的试剂盒。

[0016] 通过下文参考附图进行的详细描述,本公开的前述和其它目的、特征和优点将变得更加明显。

### 附图说明

[0017] 图1A-1C:抗因子XII抗体5C12对血浆凝血的影响。使用合成脂质试剂进行标准活化部分凝血活酶时间(aPTT)测定。(图1A-1B)在进行aPTT测定之前,让不断增加浓度的5C12(○)以及对照非抑制性抗FXII抗体(●)与人(图1A)或狒狒(图1B)贫血小板血浆孵育5分钟。数据是2-6次凝血时间的平均值。(图1C)比较玉米胰蛋白酶抑制剂(CTI)(已知的FXII抑制剂)的剂量依赖性aPTT延长(◆)与5C12抑制FXII后的aPTT延长(○)。

[0018] 图2A-2F:FXII浓度对血浆凝血的影响。将不同物种的正常贫血小板血浆连续稀释进FXII缺乏的人血浆,得到含0.006-100%FXII的贫血小板血浆。在aPTT测量前,血浆只用缓冲液(●)或用20 $\mu$ g/ml 5C12(○)孵育5分钟。对以下物种就5C12与这些物种FXII的交叉反应性进行了测试:人(图2A)、狒狒(图2B)、食蟹猴(cynomolgus monkey)(图2C)、恒河猴(rhesus macaque)(图2D)、小鼠(图2E)和大鼠(图2F)。曲线右移表示5C12与被测物种的交叉反应性。

[0019] 图3A-3C:5C12的物种特异性。(图3A)通过SDS-PAGE色谱法大小分级的来自不同物种(每个泳道上方所示)的贫血小板血浆的蛋白质印迹。按字母顺序排列的物种包括:非洲绿猴、狒狒、小猎犬、猫、牛、鸡、食蟹猴、狗、大象、巨型食蚁兽、马、人、缺乏FXII的人、美洲驼、狨猴、猪、兔、浣熊、大鼠、红袋鼠、恒河猴和老虎。所有凝胶中分别使用人血浆和FXII缺乏的血浆作为阳性和阴性对照。抗体5C12在SDS-PAGE凝胶上识别其非还原状态的重组和血浆来源的FXII,但不识别还原形式的重组或血浆FXII(图3B)。5C12还识别 $\alpha$ (包括FXII的轻链和重链)和 $\beta$ (仅包括轻链和重链的九肽片段)形式的活化的FXII(FXIIa)(图3C)。所有蛋白质印迹的一级抗体为鼠5C12,二级抗体为山羊抗小鼠多克隆的。

[0020] 图4A-4E:5C12抑制FXII活化和FXIIa活性。(图4A-4B)5C12或对照非抑制性FXII抗体与FXII在室温(RT)下预孵育10分钟,然后添加到短聚磷酸盐(图4A)或长聚磷酸盐(图4B)、高分子量激肽原(HK)和前激肽释放酶(PK)的溶液中,最终浓度为50nM FXII、10 $\mu$ M聚磷酸盐、12.5nM PK和12.5nM HK,以及不同浓度的抗体(0-100nM)。样品在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。然后用大豆胰蛋白酶抑制剂(50 $\mu$ g/ml)抑制PK,并且用聚凝胺(6 $\mu$ g/ml)中和聚磷酸盐,并且通过添加显色底物Spectrozyme FXIIa(最终浓度为0.5mM)来测定FXIIa。(图4C)5C12或对

照抗体 (0-80nM) 与FXII (40nM) 在RT下预孵育10分钟。然后以1 $\mu$ g/ml的最终浓度将硫酸葡聚糖添加到每个样品中,并且样品在37 $^{\circ}$ C下孵育20分钟。通过添加显色底物Spectrozyme FXIIa (最终浓度为0.5mM) 来测定FXIIa。(图4D) 5C12或对照抗体 (0-40nM) 与FXIIa (20nM) 预孵育10分钟。然后通过添加显色底物Spectrozyme FXIIa (最终浓度为0.5mM) 来测定FXIIa活性。符号是(○) 5C12, (●) 对照抗体。(图4E) 人FXII (100nM) 与5nM人激肽释放酶和10 $\mu$ g/ml硫酸葡聚糖在37 $^{\circ}$ C下在存在或不存在100nM 5C12的情况下孵育0、15、30和60分钟。将40 $\mu$ g/ml CTI加入每个样品以阻断FXIIa的活性。样品在还原条件下通过SDS-PAGE分离,转移到PVDF膜上,并且用抗FXII抗体进行免疫印迹。使用ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 检测蛋白质。

[0021] 图5A-5H: 体内5C12抗体活性的时间过程。单只狒狒 (*Papio anubis*) 静脉注射6剂1mg/kg 5C12, 间隔40分钟, 组合剂量为6mg/kg。在指定的时间点将血样抽取到1/10体积的3.2%柠檬酸钠中, 并处理成贫血小板血浆。第二份血样被抽取到EDTA-K2涂覆的试管中, 用于测量全血细胞计数。使用aPTT (图5A)、凝血酶原时间 (PT) (图5B) 和活化凝血时间 (ACT) (图5C) 测量血浆凝血。使用Enzygnost TAT micro ELISA试剂盒 (西门子医学诊断产品有限公司) 测量凝血酶-抗凝血酶时间 (TAT) (图5D)。在采集血样的每天进行全血细胞计数 (CBC)。显示血小板计数 (图5E)、血细胞比容 (图5F)、白细胞计数 (图5G) 和红细胞计数 (图5H)。所有测量值都在狒狒的正常范围内。这些参数的正常范围由每个插图中的虚线表示。

[0022] 图6A-6E: 表面引发血栓形成的狒狒模型。(图6A) 将婴儿 (baby) 体外膜肺氧合器 (ECMO, Capriox Baby RX05, Terumo Corporation) 插入幼年雄性狒狒 (*Papio Anubis*) 的长期 (chronic) AV分流 (shunt) 中, 并放置在GE-Brivo NM 615核医学成像系统的中心。通过ECMO装置的血流量由远端钳夹调节至流量为100ml/min, 实验持续60分钟。用 $^{111}$ In标记血小板, 以便能够实时监测ECMO装置中的血小板沉积。除对照研究 (●) 外, 每个实验前均给予处理。实验前15分钟通过弹丸静脉注射施用20U/kg肝素 (◆)。实验前30分钟通过静脉弹丸注射给予5mg/kg 5C12 (○)。5C12与肝素的联合研究 (◇) 在首次5C12给药48小时后进行, 并且给予第二次“加满 (top off)” 剂量为2mg/kg的5C12以及新剂量为20U/kg的肝素。图6B显示了研究的后半部分 (30-60分钟) 期间的血小板沉积速率 (每分钟沉积十亿个血小板)。图6C-6D分别显示了ECMO装置中形成的血栓的终末血小板计数和纤维蛋白含量, 而图6E显示了这两个参数之间的相关性。

[0023] 图7A-7C: ECMO分流研究期间的血浆凝血测量。在ECMO血栓形成研究的开始 (白条) 和结束 (黑条) 抽取血样, 放入1/10体积的3.2%柠檬酸钠中。直接在全血中测量ACT (图7B)。使用贫血小板血浆测量aPTT (图7A) 和PT (图7C)。

[0024] 图8A-8B: ECMO分流研究结束时的血栓形成标记物的测量。测量的血栓形成标记物是使用Enzygnost TAT micro ELISA试剂盒 (西门子医学诊断产品有限公司) 的凝血酶-抗凝血酶 (TAT) (图8A), 和使用人CXCL4/PF4 DuoSet ELISA试剂盒 (Bio-Techne Corporation, Minneapolis, MN) 的血小板因子4 (图8B)。显示的数据是在每次研究结束时获取的测量值。研究前获取的基线测量值彼此没有差异, 并且显示在每个插图的左侧。

[0025] 图9A-9C: AV分流研究期间的止血评估。在每项分流血栓形成研究中, 在研究中花15分钟进行两次止血测量。出血时间 (图9A) 使用标准模板皮肤出血时间试验 (Surgicutt $^{\circledR}$ , International Technidyne Corp, Piscataway, NJ) 进行测量, 并使用手动秒表进行记录。

使用Whatman吸墨纸每隔30秒收集一次伤口流出的血滴(图9B)。出血量使用这种吸墨纸和Drabkin's试剂(Sigma)进行评估,Drabkin's试剂是定量的比色化学物质,可以测定全血中的血红蛋白浓度。将吸墨纸上的干血样浸泡在2.5mL Drabkin's试剂中,直至完全溶解。在540nm处测量吸光度,并与使用受试动物血液的标准曲线进行比较。出血速率计算为出血量与时间的比值(图9C)。每个数据点代表一个测量值。

[0026] 图10A-10F:掺杂的(spiked)人血样的凝血评估。从6名志愿者采集血样,放入1/10体积的3.2%柠檬酸钠中。(图10A)产生贫血小板血浆并用载体(●)或40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  5C12(○)掺杂,在测量aPTT之前孵育5分钟。(图10B)全血用载体(●)或40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  5C12(○)掺杂,并在离心前孵育15min,以获得贫血小板血浆和aPTT测量。(图10C-10F)使用ROTEM®delta全血分析仪(Tem Systems, Inc. Research Triangle Park, NC)测定血栓弹力图(thromboelastometry)。全血用载体(●)或40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  5C12(○)掺杂并孵育5分钟。在专用ROTEM®比色杯中,混合20 $\mu\text{l}$  200mM氯化钙和300 $\mu\text{l}$ 血液,并使用自动移液系统和ROTEM®delta分析仪计时开始测量。所示参数为:(图10C)凝血时间(CT),直到凝块开始形成的时间;(图10D)凝块形成时间(CFT),凝块开始到凝块达到20mm力的强度之间的时间;(图10E)最大凝块强度(MCF),凝块的最大强度;和(图10F) $\alpha$ 角,达到凝块形成的最大速度的时间测量。

[0027] 图11:人源化抗体和嵌合抗体的ELISA曲线拟合。每个人源化抗体、嵌合亲本抗体和人Fc同种型对照抗体与人FXII的结合数据以半对数标度绘制。样品一式两份进行,每个数据点代表重复的平均值 $\pm$ SEM。

[0028] 图12:人源化抗体对浓度-反应aPTT曲线的影响。所有9种人源化抗体均以浓度依赖性方式延长aPTT。抗体的最高可能终浓度取决于储备浓度,为75或100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。每个样品一式两份进行,每个数据点代表重复的平均值 $\pm$ SEM。

[0029] 图13:人源化抗体对FXIIa活性的影响。所有人源化抗体(10nM)均抑制FXIIa(20nM)活性。每个样品一式两份进行。将FXIIa活性产生的 $V_{\text{max}}$ (对照)设置为100%,并将每种抗体与对照进行比较。显示的数据是重复的平均值 $\pm$ SEM。

[0030] 图14A-14B:AB053(5C12)和AB054在人和狒狒血浆aPTT上的比较。AB053(图14A)与人源化AB054(图14B)在人(实心圆)和狒狒(开放圆)血浆aPTT上的比较。数据代表1至5次实验的平均值 $\pm$ SEM。

[0031] 图15A-15C:膜肺氧合灌注实验中的aPTT、ACT和PT测量。在灌注开始(0min)和灌注结束(60min)时,评估每个治疗组的凝血参数,包括aPTT(图15A)、ACT(图15B)和PT(图15C)。如果给予肝素,则在肝素施用前(肝素前)进行测量。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0032] 图16A-16C:膜肺氧合器灌注实验中的初期止血(primary hemostasis)测量。灌注开始后约15分钟,评估AB054对出血时间(图16A)、出血量(图16B)和出血速率(图16C)的影响。在每次灌注实验中进行两次测量,平均值用黑线表示。

[0033] 图17A-17B:膜肺氧合器内的血小板聚集。在60分钟的灌注实验中,实时测量膜肺氧合器内的血小板聚集。(图17A)将氧合器放置在 $\gamma$ 照相机的顶部,并在5分钟的帧内记录发射的放射性。(图17B)当血栓生成发展时,实验后半部分(30到60分钟)中每分钟的平均沉积速率。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0034] 图18A-18B:膜肺氧合器内的终末血小板和纤维蛋白的测量。(图18A)在冲洗的、充

满生理盐水的装置中测量膜肺氧合器灌注60分钟后的最终血小板沉积。(图18B) 在铟-111的放射性衰减后测量碘-125标记的纤维蛋白含量。数据表示为平均值±SEM。

[0035] 图19:实验时间线。在单只狒狒中进行了72次为期7周的血栓形成实验。在每个研究日,利用一个胶原蛋白涂覆和一个组织因子涂覆的串联的移植物进行两次灌注实验(即,每天4个移植物实验)。狒狒每周接受一剂AB054 (9mg/kg) (箭头),并在同一天以及随后两天进行实验。实验日和处理组用垂直线表示。在最后剂AB054之后,给药后1周和2周进行实验。在第1周和抗体清除后第7周进行生理盐水对照。所有组N=6。

[0036] 图20A-20D:移植物灌注实验中的aPTT和ACT测量。灌注开始(0min)和灌注结束(60min)时测量各治疗组的凝血参数,包括aPTT(图20A、20B)和ACT(图20C、20D)。数据按时间(图20A、20C)或治疗组(图20B、20D)分组。所有组N=6。数据表示为平均值±SEM。与生理盐水相比\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0037] 图21A-21B:移植物灌注实验期间的PT测量。在灌注开始(0分钟)和灌注结束(60分钟)时,对每个治疗组测量使用PT的止血评估。数据按时间(图21A)或治疗组(图21B)分组。所有组N=6。数据表示为平均值±SEM。

[0038] 图22:移植物灌注实验期间的出血测量。灌注开始后约15分钟评估AB054对出血时间的影响。在每次灌注实验中进行一次测量。数据显示为平均值±SEM的散点图。

[0039] 图23A-23D:胶原蛋白涂覆的移植物中的血小板聚集。在60分钟灌注实验期间,胶原蛋白涂覆的移植物中的实时血小板聚集。(图23A)移植物自身内的移植物血栓。(图23B)移植物远端的尾部(tail)血栓。(图23C)移植物和尾部组合的总的血小板聚集。每组N=6(图23D)AB054给药后所有实验组合的总血小板聚集(AB054后N=30)。数据表示为平均值±SEM。仅对完全血栓进行统计分析(图23C和23D);与生理盐水相比\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0040] 图24A-24D:组织因子涂覆的移植物中的血小板聚集。在60分钟灌注实验期间,组织因子涂覆的移植物中的实时血小板聚集。(图24A)移植物自身内的移植物血栓。(图24B)移植物远端的尾部血栓。(图24C)移植物和尾部组合的总的血小板聚集。每组N=6。(图24D)AB054给药后所有实验组合的总血小板聚集(AB054后N=30)。数据表示为平均值±SEM。

[0041] 图25A-25F:胶原蛋白涂覆的移植物中的终末血小板聚集和纤维蛋白含量的测量。60分钟灌注后,在冲洗的、充满生理盐水的分流环(shunt loop)中测量在胶原蛋白涂覆的移植物和尾部远端中的最终血小板沉积(图25A-25C)。在<sup>111</sup>In的放射性衰减后测量<sup>125</sup>I标记的纤维蛋白含量(图25D-25F)。数据表示为平均值±SEM;与生理盐水相比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0042] 图26A-26F:组织因子涂覆的移植物中的终末血小板聚集和纤维蛋白含量的测量。60分钟灌注后,在冲洗的、充满生理盐水的分流环中测量组织因子涂覆的移植物和尾部远端中的最终血小板沉积(图26A-26C)。在<sup>111</sup>In的放射性衰减后测量<sup>125</sup>I标记的纤维蛋白含量(图26D-26F)。数据表示为平均值±SEM。

[0043] 图27A-27E:全血细胞计数。在灌注开始(0分钟)和灌注结束(60分钟)时测量每个治疗组的全血细胞计数。测量的参数包括血小板计数(图27A)、血细胞比容(图27B)、白细胞计数(图27C)、红细胞计数(图27D)和平均血小板体积(图27E)。在活动性血栓形成过程中,白细胞计数增加,血小板计数减少,而其它参数保持不变。重复施用AB054对狒狒的全血细胞计数没有影响。数据表示为平均值±SEM。

**[0044]** 序列表

[0045] 随附的序列表中列出的核酸和氨基酸序列使用如37 C.F.R.1.822所定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码显示。每个核酸序列仅显示一条链,但是任何提及显示的链时,互补链应理解为包括在内。序列表以ASCII文本文件提交,创建于2019年11月1日,43.2KB,在此被援引加入本文。在随附的序列表中:

- [0046] SEQ ID NO:1是5C12重链的氨基酸序列。
- [0047] SEQ ID NO:2是5C12 VH结构域的氨基酸序列。
- [0048] SEQ ID NO:3是5C12轻链的氨基酸序列。
- [0049] SEQ ID NO:4是5C12 VL结构域的氨基酸序列。
- [0050] SEQ ID NO:5是5C12重链的cDNA序列。
- [0051] SEQ ID NO:6是5C12轻链的cDNA序列。
- [0052] SEQ ID NO:7是人源化HC1重链的氨基酸序列。
- [0053] SEQ ID NO:8是人源化HC1 VH结构域的氨基酸序列。
- [0054] SEQ ID NO:9是人源化LC1轻链的氨基酸序列。
- [0055] SEQ ID NO:10是人源化LC1 VL结构域的氨基酸序列。
- [0056] SEQ ID NO:11是人源化HC1重链的cDNA序列。
- [0057] SEQ ID NO:12是人源化LC1轻链的cDNA序列。
- [0058] SEQ ID NO:13是人源化HC2重链的氨基酸序列。
- [0059] SEQ ID NO:14是HC2 VH结构域的氨基酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:15是人源化HC3重链的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:16是HC3 VH结构域的氨基酸序列。
- [0062] SEQ ID NO:17是人源化LC2轻链的氨基酸序列。
- [0063] SEQ ID NO:18是LC2 VL结构域的氨基酸序列。
- [0064] SEQ ID NO:19是人源化LC3轻链的氨基酸序列。
- [0065] SEQ ID NO:20是LC3 VL结构域的氨基酸序列。
- [0066] SEQ ID NO:21是人源化HC2重链的cDNA序列。
- [0067] SEQ ID NO:22是人源化LC2轻链的cDNA序列。
- [0068] SEQ ID NO:23是人源化HC3重链的cDNA序列。
- [0069] SEQ ID NO:24是人源化LC3轻链的cDNA序列。

**具体实施方式**

- [0070] I. 缩略词
- [0071] ACT 活化凝血时间(activated clotting time)
- [0072] aPTT 活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time)
- [0073] AV 动静脉(arteriovenous)
- [0074] bpm 每分钟十亿(billion per min)
- [0075] BT 出血时间(bleeding time)
- [0076] CBC 全血细胞计数(complete blood count)
- [0077] CTI 玉米胰蛋白酶抑制剂(corn trypsin inhibitor)

- [0078] ECMO 体外膜肺氧合(extracorporeal membrane oxygenation)
- [0079] ECOS 体外器官支持系统(extracorporeal organ support systems)
- [0080] FXII 血液蛋白因子XII(blood protein factor XII)
- [0081] FXIIa 活化的FXII(activated FXII)
- [0082] HK 高分子量激肽原(high-molecular-weight kininogen)
- [0083] i.v. 静脉内(intravenous)
- [0084] MAbs 单克隆抗体(monoclonal antibody)
- [0085] PF4 血小板因子4(platelet factor 4)
- [0086] PK 前激肽释放酶(prekallikrein)
- [0087] PT 凝血酶原时间(prothrombin time)
- [0088] TAT 凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex)
- [0089] II. 术语和方法

[0090] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可参见Benjamin Lewin, *Genes*, Jones & Bartlett出版社出版,2009年;和Meyers等人(编辑), *The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH出版,16卷,2008年;以及其它类似的参考文献。

[0091] 为了便于审阅本公开的各种实施方式,提供以下对特定术语的解释:

[0092] 施用/给药(administration):通过选择的途径将组合物引入受试者。例如,如果选择的途径是静脉内,则通过将组合物引入受试者的静脉来施用组合物。

[0093] 抗体:包含至少一个识别和结合(例如特异性识别和特异性结合)抗原表位的可变区的多肽配体。哺乳动物免疫球蛋白分子由重(H)链和轻(L)链组成,它们各自具有可变区,分别称为可变重( $V_H$ )区和可变轻( $V_L$ )区。 $V_H$ 区和 $V_L$ 区合起来负责结合抗体识别的抗原。哺乳动物免疫球蛋白有五种主要的重链类别(或同种型),它们决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。哺乳动物中未发现的抗体同种型包括IgX、IgY、IgW和IgNAR。IgY是鸟类和爬行动物产生的主要抗体,在功能上与哺乳动物IgG和IgE相似。IgW和IgNAR抗体是软骨鱼类产生的,而IgX抗体是在两栖动物中发现的。

[0094] 抗体可变区包含“骨架”区和高变区,高变区称为“互补决定区”或“CDR”。CDR主要负责与抗原表位的结合。抗体的骨架区用于在三维空间中定位和排列CDR。给定CDR的氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的编号方案中的任何一种来容易地确定,包括Rabat等人描述的那些(Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991; the “Kabat” numbering scheme), Chothia et al. (see Chothia and Lesk, *J Mol Biol* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:877, 1989; and Al-Lazikani et al., *JMB* 273, 927-948, 1997; the “Chothia” numbering scheme), 以及ImmunoGeneTics (IMGT) 数据库(参见Lefranc, *Nucleic Acids Res* 29:207-9, 2001; the “IMGT” numbering scheme)。Kabat和IMGT数据库保持在线。

[0095] “单域抗体”是指具有单个结构域(可变结构域)的抗体,其能够在不存在另外抗体结构域的情况下特异性结合抗原或抗原表位。单域抗体包括例如 $V_H$ 结构域抗体、 $V_{NAR}$ 抗体、骆驼科 $V_{H1}$ 抗体和 $V_L$ 结构域抗体。 $V_{NAR}$ 抗体是由软骨鱼类产生的,例如铰口鲨(nurse shark)、须鲨(wobbegong shark)、白斑角鲨(spiny dogfish)和竹鲨(bamboo shark)。骆驼科 $V_{H1}$ 抗

体是由几种物种产生的,包括骆驼、美洲驼(llama)、羊驼(alpaca)、单峰骆驼(dromedary)和guanaco,其产生天然缺乏轻链的重链抗体。

[0096] “单克隆抗体”是由淋巴细胞的单个克隆或由已经转染了单个抗体的编码序列的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0097] “嵌合抗体”具有来自一种物种(例如人)的骨架残基和来自另一物种的CDR(其通常赋予抗原结合)。

[0098] “人源化”抗体是包括人骨架区和来自非人类(例如小鼠、兔、大鼠、鲨鱼或合成的)免疫球蛋白的一个或更多个CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人类免疫球蛋白被称为“供体”,而提供骨架的人免疫球蛋白被称为“受体”。在一个实施方案中,所有CDR都来自人源化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白。恒定区不必存在,但是如果存在,则它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本一致,例如至少约85-90%,例如约95%或更高一致。因此,可能除了CDR外,人源化免疫球蛋白的所有部分与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本一致。人源化抗体与提供CDR的供体抗体结合到相同的抗原。人源化或其它单克隆抗体可以具有另外的保守氨基酸取代,其对抗原结合或其它免疫球蛋白功能基本没有影响。

[0099] 抗凝剂:防止或抑制血液凝结的化合物(例如药物试剂或分子)。药物抗凝剂可用于治疗血栓形成疾病,例如深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗死和中风。

[0100] 抗原结合片段:单克隆抗体的一部分,保留了其特异性结合单克隆抗体所针对的抗原的能力。抗原结合片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab)'<sub>2</sub>片段、单链Fv蛋白(scFv)和二硫键稳定的Fv蛋白。

[0101] 抗血栓形成剂:任何防止或抑制血栓形成的化合物(例如药物试剂或分子)。抗血栓形成剂包括抗凝剂(其限制血小板凝结的能力)、抗血小板药物(其限制血小板的迁移和聚集)和溶栓药物(在形成凝块后溶解凝块)。

[0102] 结合亲和力:抗体对抗原的亲和力。在一个实施方案中,通过Frankel et al., Mol. Immunol., 16: 101-106, 1979描述的改良的Scatchard方法来计算亲和力。在另一个实施方案中,通过抗原/抗体解离速率来测量结合亲和力。在另一个实施方案中,通过竞争性放射免疫测定法来测量高结合亲和力。在另一个实施方案中,通过ELISA来测量结合亲和力。在另一个实施方案中,通过流式细胞术来测量抗体亲和力。“特异性结合”抗原的抗体(例如FXII)是以高亲和力结合抗原并且不显著结合其它不相关抗原的抗体。

[0103] 凝血:纤维蛋白单体聚合的过程,导致血液或血浆从液态转变为凝胶态。液态血液的凝固可能发生在体外、血管内或裸露且损伤的组织表面。体外血液凝固导致凝胶化的血液,除了纤维蛋白原含量减少和纤维蛋白相应增加以外,其维持细胞和其它血液成分的相对比例与未凝固血液中发现的基本相同。

[0104] 互补决定区(CDR):高变氨基酸序列的区域,定义抗体的结合亲和力和特异性。

[0105] 补体系统:免疫系统(特别是先天免疫系统)的一部分,在传染性生物的裂解、炎症的激活、调理作用和免疫清除中起主要作用。

[0106] 偶联物:共价连接到效应分子(例如可检测标签)或二级蛋白质(例如二级抗体)的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)。效应分子可以是例如药物、毒素、治疗剂、可检测标签、蛋白质、核酸、脂质、纳米颗粒或碳水化合物。抗体偶联物通常被称为“免疫偶联物”。

[0107] 保守变体：“保守”氨基酸取代是基本不影响或降低蛋白质(例如针对FXII的抗体)的亲力的那些取代。例如,特异性结合FXII的单克隆抗体可包括最多约1个、最多约2个、最多约5个、最多约10个或最多约15个保守取代,并特异性结合FXII。术语“保守变体”还包括使用取代的氨基酸代替未取代的亲本氨基酸,前提是抗体特异性结合FXII。非保守取代是降低活性或与FXII结合的那些。

[0108] 提供功能上相似的氨基酸的保守氨基酸取代表是本领域普通技术人员众所周知的。以下六组是被认为是彼此的保守取代的氨基酸的实例:

[0109] 1) 丙氨酸(A), 丝氨酸(S), 苏氨酸(T);

[0110] 2) 天冬氨酸(D), 谷氨酸(E);

[0111] 3) 天冬酰胺(N), 谷氨酰胺(Q);

[0112] 4) 精氨酸(R), 赖氨酸(K);

[0113] 5) 异亮氨酸(I), 亮氨酸(L), 甲硫氨酸(M), 缬氨酸(V); 和

[0114] 6) 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y), 色氨酸(W)。

[0115] 接触: 布置成直接物理关联; 包括固态和液态。

[0116] 可检测标签: 直接或间接与另一种分子(例如抗体或蛋白质)结合的可检测化合物或组合物, 以便于检测该分子。可检测标签的具体的非限制性实例包括荧光标签、酶连接和放射性同位素。在一个实例中, “标记的抗体”是指在抗体中加入另一种分子。例如, 标签是可检测的标志物, 例如放射性标记的氨基酸的加入或可被标记的亲合素(例如, 含有可通过光学或比色方法检测的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素)检测的生物素化部分的多肽的附着。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。多肽标记的实例包括但不限于以下: 放射性同位素或放射性核苷酸(例如<sup>35</sup>S、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>19</sup>F、<sup>99m</sup>Tc、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In和<sup>125</sup>I)、荧光标签(例如异硫氰酸荧光素(FUC)、罗丹明、镧系元素荧光粉)、酶标签(例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标志物、生物素化基团、被二级报告分子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、表位标签)或磁性剂(例如钆螯合物)。在一些实施方案中, 标签通过各种长度的间隔臂连接以减少潜在的空间位阻。

[0117] 表位: 抗原决定簇。这些是具有抗原性(其引发特异性免疫反应)的分子上的特定化学基团或肽序列。抗体特异性结合多肽(例如FXII)上的特定抗原表位。

[0118] 因子XII (FXII或fXII): 人凝血因子XII的任何变体、同种型和/或物种同源物, 也称为Hageman因子, 自然由细胞表达并存在于血浆中。FXII是血浆糖蛋白, 参与凝血、纤维蛋白溶解以及缓激肽和血管紧张素的产生。前激肽释放酶被FXII切割形成激肽释放酶, 然后激肽释放酶切割FXII形成 $\alpha$ -FXIIa, 然后 $\alpha$ -FXIIa被胰蛋白酶切割形成 $\beta$ -FXIIa。 $\alpha$ -FXIIa由通过二硫键连接的NH<sub>2</sub>末端重链(凝血因子XIIa重链)和COOH末端轻链(凝血因子XIIa轻链)组成。 $\alpha$ -FXIIa将FXI激活为FXIa。它还驱动FVII中的Arg-|-Ile键的选择性裂解以形成FVIIa。 $\beta$ -FXIIa由通过二硫键连接的两条链组成: 轻链( $\beta$ -FXIIa第2部分), 对应于COOH末端轻链(凝血FXIIa轻链), 和九肽( $\beta$ -FXIIa第1部分)。FXII与富含组氨酸的糖蛋白(HRG)相互作用; 这种相互作用在锌离子存在下增强并受到肝素结合的抑制, 其抑制fXII自身活化和接触引发的凝血。

[0119] FXII缺陷是FXII缺乏(FA12D)的原因, 也称为Hageman因子缺乏。此特征是无症状

的体外凝血异常。它的诊断是基于在凝血试验中发现该因子的血浆活性低。通常只有通过术前血液检查才意外发现。FXII缺乏分为两类：交叉反应物质 (CRM) 阴性组 (FXII抗原检测阴性) 和CRM阳性组 (FXII抗原检测阳性)。

[0120] 骨架区：介于CDR之间的氨基酸序列。骨架区包括可变轻骨架区和可变重骨架区。骨架区用于将CDR保持在抗原结合的适当方向。

[0121] 融合蛋白：包含两种不同 (异源) 蛋白中的至少一部分的蛋白。

[0122] 止血：出血停止的生理过程。止血剂是预防、治疗或缓解异常出血 (例如由出血性疾病或出血发作引起的异常出血) 的那些。止血障碍包括，例如血小板疾病，如特发性血小板减少性紫癜，以及凝血障碍，如血友病。止血还可以指血管、血小板、凝血因子、凝血抑制剂和纤溶蛋白之间的复杂相互作用，以维持血管腔隙内的血液处于流体状态。止血系统的目的是通过在出血和血栓形成之间实现平衡来保持血管内完整性。如本文所使用的，“促进止血”是指有助于或改善受试者的止血的过程。例如，促进止血的试剂可以是减少异常出血的试剂，例如通过更快地停止出血或减少失血量。

[0123] 异源的：起源于分开的遗传来源或物种。

[0124] 增加的出血倾向：自发、过度 and/或组织损伤后延迟发作的出血。

[0125] 炎症：身体组织对有害刺激 (例如病原体、受损细胞或刺激物) 的生物防御反应的一部分。这种保护性反应涉及免疫细胞、血管和分子介质。炎症的功能是帮助消除细胞损伤的最初原因，清除因原始损伤或炎症过程而受损的坏死细胞，然后启动组织修复途径。

[0126] 抑制量或抑制剂量：足以实现对特定分子活性的抑制或对特定分子活化的抑制的特定物质的量。例如，这可以是抑制受试者或样品 (例如血浆或血清样品) 中FXII的活化和/或活性所必需的量。在一些实施方案中，FXII特异性单克隆抗体或其抗原结合片段的抑制量是抑制FXII活化至少50%所需的量。在一些实例中，抑制量是抑制FXII活化90-100%所必需的量。

[0127] 缺血性器官疾病：器官的血液供应受到剥夺、限制或阻碍的疾病、病症、状态或障碍，包括闭塞性动脉硬化、伯格 (Buerger) 病、雷诺 (Raynaud) 病、心肌梗死、心绞痛、糖尿病性神经病、椎管狭窄、脑血管意外、脑梗死、肺动脉高压、骨折和阿尔茨海默病。

[0128] 分离的：“分离的”生物成分，例如核酸、蛋白质 (包括抗体) 或细胞器，已与自然存在该成分的环境 (例如细胞) 中的其它生物成分 (例如其它染色体的和染色体外的DNA和RNA、蛋白质和细胞器) 基本分离或纯化。已经“分离”的核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包含在宿主细胞中通过重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0129] 接头：在某些情况下，接头是抗体结合片段 (例如Fv片段) 内的肽，用于将可变重链间接结合到可变轻链。“接头”也可以指用于将靶向部分 (例如抗体) 连接到效应分子 (例如可检测标签) 的肽。

[0130] 术语“偶联 (conjugating)”、“连接 (joining)”、“结合 (bonding)”或“连接 (linking)”是指使两个多肽成为一个连续的多肽分子，或将放射性核素或其它分子共价附着到多肽 (例如scFv) 上。在特定的上下文中，术语包括关于将配体 (例如抗体部分) 连接到效应分子。连接可以通过化学或重组方式进行。“化学方式”是指抗体部分和效应分子之间的反应，使得在两个分子之间形成共价键以形成一个分子。

[0131] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子(例如CMV启动子)可操作地连接到编码序列。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,在同一阅读框中。

[0132] 肠胃外:指不通过消化道(消化管)给药,例如通过皮下、肌肉内、胸骨内(intrasternal)或静脉内给药。

[0133] 病理性高凝血:遗传性或后天性疾病、疾病或状态,包括病理上快速或过度的血液凝结或增加的凝结倾向,例如可见于弥漫性血管内凝血、心脏病发作、中风、冠状动脉疾病、深静脉血栓形成、血栓栓塞疾病、肺栓塞、血管疾病、手术、创伤、恶性肿瘤、存在血管修复装置、全身麻醉、妊娠、使用口服避孕药、系统性红斑狼疮、感染、败血症、糖尿病、自身免疫性疾病、胰腺炎、肝硬化、憩室炎、抗磷脂抗体综合征、活化的蛋白C抗性、蛋白C缺乏、蛋白S缺乏、凝血因子VIII水平升高、粘性血小板综合征、高同型半胱氨酸血症、抗凝血酶缺乏、纤维蛋白溶解障碍、凝血酶原G20210A突变和血栓调节蛋白突变。

[0134] 药学上可接受的载体:所使用的药学上可接受的载体是常规的。Remington:The Science and Practice of Pharmacy,The University of the Sciences in Philadelphia,Editor,Lippincott,Williams,&Wilkins,Philadelphia,PA,21<sup>st</sup> Edition (2005),描述了适用于药学上递送本文公开的抗体的组合物和制剂。

[0135] 通常,载体的性质将取决于所采用的特定给药方式。例如,肠胃外制剂通常包括可注射流体,所述可注射流体包括药学上和生理上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为载体。对于固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可包括例如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性载体外,待施用的药物组合物还可以包含少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨醇酐单月桂酸酯。

[0136] 预防、治疗或缓解疾病:“预防”疾病是指抑制疾病的充分发展。“治疗”是指在疾病或病理状况开始发展后缓解其病征或症状的治疗性干预措施。“缓解”是指降低疾病的病征或症状的数量或严重程度。

[0137] 纯化的:术语“纯化的”不需要绝对的纯度;相反,它旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的肽制品是其中的肽或蛋白质比肽或蛋白质在其细胞内的自然环境中更富集的制品。在一个实施方案中,纯化制品,使得蛋白质或肽代表制品的总肽或蛋白质含量的至少50%。基本上纯化是指从其它蛋白质或细胞成分中纯化。基本上纯化的蛋白质的纯度至少为60%、70%、80%、90%、95%或98%。因此,在一个特定的非限制性实例中,基本上纯化的蛋白质90%不含其它蛋白质或细胞成分。

[0138] 样品(或生物样品):从受试者获得的包含基因组DNA、RNA(包括mRNA)、蛋白质或其组合的生物标本。实例包括但不限于外周血、组织、细胞、尿液、唾液、组织活检、细针抽出物、手术标本和尸检材料。

[0139] 序列一致性:氨基酸或核酸序列之间的相似性是用序列之间的相似性来表示的,亦称为序列一致性。序列一致性经常用百分比一致性(或相似性或同源性)来衡量;百分比越高,两个序列越相似。当使用标准方法进行比对时,多肽或核酸分子的同源物或变体将具有较高级别的序列一致性。

[0140] 用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。各种程序和比对算法描述于: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; 以及 Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988。Altschul et al., *Nature Genet.* 6:119, 1994, 提出了对序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0141] NCBI基本局部比对搜索工具 (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) 可从包括美国国家生物技术信息中心 (NCBI, Bethesda, MD) 和互联网上的多个来源获得, 以与序列分析程序 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 结合使用。有关如何使用此程序来确定序列一致性的说明可从互联网上的 NCBI 网站上获得。

[0142] 特异性结合 FXII 多肽的抗体的  $V_H$  的同源物和变体通常特征在于具有至少约 75%, 例如至少约 80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列一致性, 所述序列同一性是使用 NCBI Blast 2.0 在与抗体的氨基酸序列的全长比对中计数的, 空位 blastp 设置为缺省参数。为了比较大于约 30 个氨基酸的氨基酸序列, 使用设置为缺省参数 (空位存在罚分为 11, 每个残基空位罚分为 1) 的默认 BLOSUM62 矩阵采用 Blast 2 序列功能。当比对短肽 (少于约 30 个氨基酸) 时, 应采用设置为缺省参数 (空位 9, 延伸空位 1 罚分) 的 PAM30 矩阵使用 Blast 2 序列功能进行比对。当通过这种方法评估时, 与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质将显示出增加的百分比一致性, 例如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的序列一致性。当比较少于整个序列的序列一致性时, 同源物和变体将通常在 10-20 个氨基酸的短窗口上具有至少 80% 的序列一致性, 并且取决于它们与参考序列的相似性, 可能具有至少 85% 或至少 90% 或 95% 的序列一致性。在这样的短窗口上确定序列同一性的方法可在互联网上的 NCBI 网站上获得。本领域技术人员将理解, 提供这些序列一致性范围仅用于指导; 完全有可能获得超出所提供范围的非常重要的同源物。

[0143] 实体瘤癌症: 一种形成异常组织块的癌症, 通常没有囊肿或液体区域, 包括肉瘤、癌和淋巴瘤。实体瘤癌症可包括胰腺、乳腺、卵巢、前列腺、骨、膀胱、宫颈、结肠和直肠、子宫内膜、肾、唇和口腔、脑、肾、肝、皮肤、间皮、肺和甲状腺或其转移的癌症。

[0144] 受试者: 活的多细胞脊椎动物生物, 包括人类和兽医受试者的类别, 包括人类和非人类哺乳动物。在一些实施方案中, 受试者是指任何哺乳动物, 例如人类、非人灵长类动物或兽医受试者, 例如狗。

[0145] 合成的: 在实验室中通过人工方法生产的, 例如, 合成的核酸或蛋白质 (例如抗体) 可以在实验室中用化学方法合成。

[0146] 治疗有效量 (或药学上有效量): 足以在被治疗的受试者中获得期望效果的特定物质的量。例如, 这可以是抑制因子 XII 活化所需的量。术语还可以指示抗 FXII 单克隆抗体或这种抗体与另一种抗凝剂或抗血栓形成剂的组合的量, 其是有效抑制体内血栓形成或以其它方式在需要的患者体内产生可测量的益处所需的。当施用于受试者时, 通常会使用达到靶组织浓度的剂量, 所述浓度已被证明达到了期望的体外效果。精确量将取决于许多因素, 包括但不限于治疗组合物的成分和物理特性、预期的患者群体、各个患者考虑因素等, 并且可以由本领域技术人员容易地确定。

[0147] 血栓形成:在血管内形成或存在凝块(也称为“血栓”),阻碍血液通过循环系统的流动。血栓形成通常是由血液成分、血管壁质量和/或血流性质的异常引起的。凝块的形成通常是由血管壁的损伤(例如由于创伤或感染)和通过损伤点的血流缓慢或停滞引起的。在某些情况下,凝血异常会导致血栓形成。冲破限制并开始<sub>在体内移动的凝块</sub>被称为栓塞物。当血栓占动脉管腔横截面积的75%以上时,由于氧气减少(缺氧)和代谢产物(如乳酸)的积累,供应到组织的血流减少到足以引起症状。超过90%的梗阻可导致缺氧、氧气完全耗尽和梗死(细胞死亡方式)。血栓栓塞是血栓形成及其主要并发症(栓塞)的综合表现。

[0148] 载体:被引入宿主细胞中的核酸分子,从而产生转化的宿主细胞。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包括一个或多个选择性标记基因和本领域已知的其它遗传元件。

[0149] 除非另有说明,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解含义相同的含义。除非上下文另外明确指出,否则单数术语“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该/所述(the)”包括复数指代。“包括A或B”是指包括A或B或A和B。应进一步理解,对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值均为近似的,且提供用于描述。尽管在本公开的实践或试验中可以使用与本文所描述的方法和材料类似或等效的方法和材料,但是下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均以其全文形式被援引加入本文。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括术语解释)为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的,并不旨在是限制性的。

[0150] III.FXII特异性单克隆抗体

[0151] 本文公开了结合人血液蛋白因子XII(FXII)的单克隆抗体,例如小鼠单克隆抗体5C12(本文中也称为“AB053”)或其人源化形式(称为“人源化5C12”、“h5C12”或“AB054”)。抗体(或其抗原结合片段)能够与FXII形成免疫复合物并抑制FXII的活性。施用所公开的抗体抑制炎症和血栓形成,因此可用于治疗以FXII的病理学活化为特征的疾病和失调。

[0152] 下面提供了5C12重链、5C12 VH结构域、5C12轻链和5C12 VL结构域的氨基酸序列。在VH和VL结构域序列中,根据IMGT,每个CDR的位置用下划线表示。本领域技术人员可以使用任何其它编号方案(例如Kabat或Chothia编号方案)容易地确定CDR边界。重链和轻链序列中带下划线的残基表示恒定结构域。还提供了重链和轻链的cDNA序列。

[0153] 5C12重链(SEQ ID NO:1):

DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNNLEWMGYIQYSGNT  
NSNPSLKSRSITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWGSFDYWGQGTTLTVSSAK  
TTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL  
YTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPP  
KPKDVLITITLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVS  
ELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDK  
VSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEA  
GNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

[0155] 5C12 VH结构域(SEQ ID NO:2):

DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNNLEWMGYIQYSGNT  
NSNPSLKSRSITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWGSFDYWGQGTTLTVSS

[0156]

- [0157] CDR1:GYSITSGYS (SEQ ID NO:2的残基26-34)
- [0158] CDR2:IQYSGNT (SEQ ID NO:2的残基52-58)
- [0159] CDR3:ARWGSFDY (SEQ ID NO:2的残基97-104)
- [0160] 5C12轻链 (SEQ ID NO:3):
- QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVP
- [0161] ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAGDAATYYCQQWSGNPPTFGGGTILEIKRADAAPTVSIFP  
PSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSS  
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK
- [0162] 5C12 VL结构域 (SEQ ID NO:4):
- [0163] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVP  
ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAGDAATYYCQQWSGNPPTFGGGTILEIK
- [0164] CDR1:SSVNY (SEQ ID NO:4的残基27-31)
- [0165] CDR2:DTS (SEQ ID NO:4的残基49-51)
- [0166] CDR3:QQWSGNPPT (SEQ ID NO:4的残基88-96)
- [0167] 5C12重链cDNA序列 (SEQ ID NO:5)
- [0168] GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTCAAACCTTCTCAGTCACTTTCACCTCACCTGCACT  
GTCACCTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAATCTGGAATGGAT  
GGGCTACATACAGTACAGTGGTAACACTAATTTCAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACAT  
CCAAGAACCAGTTCTTCTGCATTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTATTGTGCAAGATGGGGG  
TCCTTTGACTACTGGGGCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACT  
GGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAG  
TGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTAC  
ACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGC  
CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAGG  
TATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTT  
GTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCA  
GACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCACTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGC  
TCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC  
AAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATCCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCT  
GACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACT  
ACAAGAACAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAAC  
TGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACATACTGAGAAGAGCCTCTC  
CCTCTCCTGGTAAA
- [0169] 5C12轻链cDNA序列 (SEQ ID NO:6)
- [0170] CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCTATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC  
AGTGCCAGCTCAAGTGTAATACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGA  
CACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCA  
GCAGCATGGAGGCTGGAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTAACCCACCGACGTTCCGGTGGAGGC  
ACCATACTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC

TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCA  
GTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACC  
CTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACC  
CATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

[0171] 针对抗体5C12生成了人源化重链和轻链序列。h5C12重链、轻链、VH结构域和VL结构域序列如下所示。

[0172] 人源化5C12重链(“HC1”SEQ ID NO:7)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWIGYIQYSGNTN  
SNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGLTIVTSSAST  
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLY

[0173] SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW  
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

[0174] 人源化5C12(HC1)VH结构域(SEQ ID NO:8)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWIGYIQYSGNTN  
[0175] SNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGLTIVTSS

[0176] CDR1:GYSITSGYS(SEQ ID NO:8的残基26-34)

[0177] CDR2:IQYSGNT(SEQ ID NO:8的残基52-58)

[0178] CDR3:ARWGSFDY(SEQ ID NO:8的残基97-104)

[0179] 人源化5C12轻链(“LC1”SEQ ID NO:9)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVNYLHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLATGIPAR  
[0180] FSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT  
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0181] 人源化5C12(LC1)VL结构域(SEQ ID NO:10)

[0182] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVNYLHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTD  
YTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIK

[0183] CDR1:SSVNY(SEQ ID NO:10的残基27-31)

[0184] CDR2:DTS(SEQ ID NO:10的残基49-51)

[0185] CDR3:QQWSGNPPT(SEQ ID NO:10的残基88-96)

[0186] 人源化5C12重链(HC1)cDNA序列(SEQ ID NO:11)

[0187] CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCACC  
GTGAGCGGCTACTCAATCACCTCTGGCTACAGCTGGCACTGGATCAGGCAGCACCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGAT  
TGGCTATATCCAGTACAGCGGCAACACCAACAGCAACCCAGCCTCAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAGGGATACAA  
GCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTACTACTGCGCCAGGTGGGGC  
AGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCT  
CGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTCCCTGAACCCG  
TCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGCTG

TACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCATAA  
GCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCCTGCTCCTGAAT  
TTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTCCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTC  
ACCTGCGTCTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCA  
TAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTGCCGTGCTCACCGTCTGCATC  
AGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATC  
TCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCA  
AGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTG  
AGAACAATAACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGAC  
AAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAA  
GAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCTAGTAA

[0188] 人源化5C12轻链(LC1) cDNA序列(SEQ ID NO:12)

[0189] GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCAACCTGAGCTTGGAGCCCCGGTGGAGGGCCACCCTGTCATGC  
AGGGCCAGCAGCAGCGTGAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCAGGAGGCTGATCTACGA  
CACCAGCAAGCTGGCCACCGGCATCCCCGCCAGGTTTCCGGCAGCGGGTCAGGCACCGACTACACCCTCACCATAA  
GCAGCCTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGTCAGCAGTGGAGCGGCAACCCACCTACCTTTGGCGGAGGC  
ACTAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTC  
TGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACG  
CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACC  
CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCC  
CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

[0190] 小鼠(“鼠”)和人源化(“人”)5C12重链和轻链氨基酸序列的比对如下所示。小鼠和人源化形式之间共有的氨基酸残基用星号表示。

[0191] 重链比对

CLUSTAL O(1.2.4)多序列比对

	小鼠	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNNLEWMGYIQYSGNTNS	60
	人类	QVQLQESGPGLVKPSQTLTSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWIGYIQYSGNTNS :*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	60
	小鼠	NPSLKSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWGSFDYWGQGTTLTVSSAKTTP	120
	人类	NPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGTTLTVSSASTKG *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	120
	小鼠	PSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS-DLYTL	179
	人类	PSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL ***:*** * : : * . :*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****	180
[0192]	小鼠	SSSVTVPSSTWVPTVCNVAHPASSTKVDKIVPRD-CGCKPCICT-VPEVSSVFIFFP	237
	人类	SSVTVPSSSLGKTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFFP ** *****: : * ***** * *.*****: : * * * . . *****:***	240
	小鼠	KPKDVLTLTLPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSVE	297
	人类	KPKDITLMSRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV ***** * * : * :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	300
	小鼠	LPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSL	357
	人类	LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL * : :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	360
	小鼠	TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNFTFC	417
	人类	TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC **::..*.*.***:***: ***** :***. * *:::***:***:***:***:***:***:***	420
	小鼠	SVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK	439 (SEQ ID NO: 1)
	人类	SVMHEALHNNHYTQKSLSLSLG-	441 (SEQ ID NO: 7)
		***:***.***:***:*** * *	

[0193] 轻链比对

	小鼠	QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVNYMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAR	60
	人类	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVNYLHWYQKPGQAPRRLIYDTSKLATGIPAR :***** : * *****: : * * *****:***** * : * * *****:*****	60
[0194]	小鼠	FSGSGSGTSYSLTISMEAGDAATYYCQQWSGNPPTFGGGTILEIKRADAAPTVISIFPPS	120
	人类	FSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS *****.*:*****:* * *.*****:*****:*****:*****:*****:*****	120
	小鼠	SEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTL	180
	人类	DEQLKSGTASVVCFLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTL .***.* *****:*****: : * * * . : . . . : * * :*****:*****	180
[0195]	小鼠	TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	213 (SEQ ID NO: 3)
	人类	SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	213 (SEQ ID NO: 9)
		: * :***: * : * * . *** : ** : . ***** . **	

[0196] 备选的人源化重链和轻链序列

[0197] 在人源化过程中,总共开发了3个人源化重链(HC1、HC2、HC3)和3个人源化轻链(LC1、LC2、LC3)序列。产生并测试了包含人源化重链和轻链的所有9种可能组合的人源化抗体:(1)HC1+LC1;(2)HC1+LC2;(3)HC1+LC3;(4)HC2+LC1;(5)HC2+LC2;(6)HC2+LC3;(7)HC3+LC1;(8)HC3+LC2;和(9)HC3+LC3。所有测试的抗体对FXII表现出相似的结合亲和力,并具有相似的FXII抑制活性(通过aPTT试验确定)。

[0198] 人源化5C12抗体(也称为“AB054”)由HC1+LC1组成(SEQ ID NO:8和10)。HC2、HC3、LC2和LC3的重链、VH结构域、轻链、VL结构域和cDNA序列如下所示。鼠5C12 HC、人源化5C12

HC、HC2和HC3的CDR序列相同,鼠5C12 LC、人源化5C12LC、LC2和LC3的CDR序列相同;只有骨架残基在不同的重链和轻链序列中变化。

- [0199] HC2重链 (SEQ ID NO:13)
- [0200] DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMGYIQYSGNTNSNPSLKSRVT  
ISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD  
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP  
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
- [0201] HC2 VH结构域 (SEQ ID NO:14)
- [0202] DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMGYIQYSGNT  
NSNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGLTVTVSS
- [0203] CDR1:GYSITSGYS (SEQ ID NO:14的残基26-34)
- [0204] CDR2:IQYSGNT (SEQ ID NO:14的残基52-58)
- [0205] CDR3:ARWGSFDY (SEQ ID NO:14的残基97-104)
- [0206] HC3重链 (SEQ ID NO:15)
- [0207] DVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEWIGYIQYSGNTNSNPSLKSRVT  
ISRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD  
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP  
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
- [0208] HC3 VH结构域 (SEQ ID NO:16)
- [0209] DVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEWIGYIQYSGNTN  
SNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGMVTVSS
- [0210] CDR1:GYSITSGYS (SEQ ID NO:16的残基26-34)
- [0211] CDR2:IQYSGNT (SEQ ID NO:16的残基52-58)
- [0212] CDR3:ARWGSFDY (SEQ ID NO:16的残基97-104)
- [0213] LC2轻链 (SEQ ID NO:17)
- [0214] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRWIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTD  
YTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0215] LC2 VL结构域 (SEQ ID NO:18)
- [0216] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRWIYDTSKLATGIPAR  
FSGSGSGTDYTLTSSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIK
- [0217] CDR1:SSVNY (SEQ ID NO:18的残基)
- [0218] CDR2:DTS (SEQ ID NO:18的残基)
- [0219] CDR3:QQWSGNPPT (SEQ ID NO:18的残基)
- [0220] LC3轻链 (SEQ ID NO:19)

[0221] DIVLTQTPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRLIYDTSKLATGIPARFSGSGSGTD  
YTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0222] LC3 VL结构域 (SEQ ID NO:20)

[0223] DIVLTQTPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRLIYDTSKLATGIPAR  
FSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGQGTRLEIK

[0224] CDR1:SSVNY (SEQ ID NO:20的残基27-31)

[0225] CDR2:DTS (SEQ ID NO:20的残基49-51)

[0226] CDR3:QQWSGNPPT (SEQ ID NO:20的残基88-96)

[0227] HC2重链cDNA序列 (SEQ ID NO:21)

[0228] GACGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCACC  
GTGACCGGCTACTCAATCACCTCTGGCTACAGCTGGCACTGGATCAGGCAGCACCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGAT  
GGGCTATATCCAGTACAGCGGCAACACCAACAGCAACCCAGCCTCAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAGGGATAACA  
GCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTGGGGC  
AGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTTCTGCTAGACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCT  
CGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCG  
TCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCTCCACACATTCCCCGCTGTCTCTGCAGAGCAGCGCCTG  
TACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCATAA  
GCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCTTGCCTGCTCCTGAAT  
TTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTC  
ACCTGCGTCTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCA  
TAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTCTCCGTGCTCACCGTCTGCATC  
AGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATC  
TCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCA  
AGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCTCCGACATCGCTGTGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTG  
AGAACAATAACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGAC  
AAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTACAGTGTCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAA  
GAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCTAGTAA

[0229] LC2轻链cDNA序列 (SEQ ID NO:22)

[0230] GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCAACCTGAGCTTGAGCCCCGGTGAAGGGCCACCCTGTCATGC  
AGGGCCAGCAGCAGCGTGAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCAAGAGGTGGATCTACGA  
CACCAGCAAGCTGGCCACCGGCATCCCCGCCAGGTTTTCCGGCAGCGGGTCAGGCACCGACTACACCCTCACCATAA  
GCAGCCTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGTCAGCAGTGGAGCGGCAACCCACCTACCTTTGGCGGAGGC  
ACTAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTC  
TGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACG  
CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACC  
CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCC  
CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

[0231] HC3重链cDNA序列 (SEQ ID NO:23)

[0232] GACGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACC GTGAGCGGCTACTCAATCACCTCTGGCTACAGCTGGCACTGGATCAGGCAGCCACCCGCAAGGGCCTGGAGTGGAT TGGCTATATCCAGTACAGCGGCAACACCAACAGCAACCCCAAGCCTCAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAGGGATACAA GCAAGAACCAGTTCAGCCTGAGGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTGGGGC AGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCT CGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCG TCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCATAA GCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCTTGCCTGCTCCTGAAT TTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTC ACCTGCGTTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCA TAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTTCGTGTCCGTGCTCACCGTCTGCATC AGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATC TCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCA AGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTACCCTCCGACATCGCTGTGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTG AGAACAACACTACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGAC AAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTACAGTGTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAA GAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCTAGTAA

[0233] LC3轻链cDNA序列 (SEQ ID NO:24)

[0234] GACATCGTGCTGACCCAGACCCCAGCAACCCTGAGCTTGAAGCCCGGTGAGAGGGCCACCCTGTCATGC AAGGGCCAGCAGCAGCGTGAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCAAGAGGCTGATCTACGA CACCAGCAAGCTGGCCACCGGCATCCCCGCCAGGTTTTCCGGCAGCGGGTCAGGCACCGACTACACCCTCACCATAA GCAGCCTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGTCAGCAGTGGAGCGGCAACCCACCTACCTTTGGCCAGGGC ACTAGGTTGGAGATCAAGCGGACCGTGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTC TGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCTCCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGCTAA

[0235] 本文提供了结合(例如特异性结合)FXII的单克隆抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,单克隆抗体或抗原结合片段包括VH结构域和VL结构域两者。

[0236] 在一些实施方案中,结合FXII的单克隆抗体或抗原结合片段包括来自抗体5C12的至少一个CDR序列。在一些实施方案中,使用IMGT、Kabat或Chothia编号方案确定CDR序列。

[0237] 在一些实施方案中,FXII特异性单克隆抗体或抗原结合片段包括VH结构域和VL结构域,并且抗体的VH结构域包括SEQ ID NO:2的一个、两个或全部三个CDR序列,和/或抗体的VL结构域包括SEQ ID NO:4的一个、两个或全部三个CDR序列。在一些实例中,VH结构域包括SEQ ID NO:2的残基26-34、52-58和97-104,并且VL结构域包括SEQ ID NO:4的残基27-31、49-51和88-96。

[0238] 在特定的实例中,VH结构域包括SEQ ID NO:2的CDR序列,并且VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16至少80%、至少85%、至

少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致；并且VL结构域包括SEQ ID NO:4的CDR序列,并且VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。在具体的非限制性实例中,VH结构域的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16组成,并且VL结构域的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20组成。在一个非限制性实例中,VH结构域的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:8组成,并且VL结构域的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:10组成。

[0239] 在一些实施方案中,单克隆抗体或抗原结合片段包括完整的重链和/或完整的轻链。在一些实例中,重链包括SEQ ID NO:2的CDR序列,并且重链的氨基酸序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%一致、至少97%、至少98%或至少99%一致;和/或轻链包括SEQ ID NO:4的CDR序列,并且轻链的氨基酸序列与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。在特定的非限制性实例中,重链的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15组成;和/或轻链的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19组成。在一个非限制性实例中,重链的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:7组成,并且轻链的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:9组成。

[0240] FXII特异性抗原结合片段可以是例如Fab片段、Fab'片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、单链可变片段(scFv)或二硫键稳定的可变片段(dsFv)。在一些实施方案中,抗原结合片段是scFv。

[0241] FXII特异性单克隆抗体可以是任何同种型,例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。在一些实施方案中,单克隆抗体是IgG。

[0242] 在一些实施方案中,单克隆抗体或抗原结合片段是人源化抗体或抗原结合片段。在一些实例中,人源化抗体的VH结构域的氨基酸序列包括SEQ ID NO:2的CDR序列,并且与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少具有96%、至少97%、至少98%或至少99%一致;和/或人源化抗体的VL结构域的氨基酸序列包括SEQ ID NO:4的CDR序列,并且与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。在具体的非限制性实例中,VH结构域的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:8组成;和/或VL结构域的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:10组成。

[0243] 在一些实施方案中,人源化单克隆抗体或抗原结合片段包括完整的重链和/或完整的轻链。在一些实例中,重链包括SEQ ID NO:2的CDR序列,并且重链的氨基酸序列与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致;和/或轻链包括SEQ ID NO:4的CDR序列,并且轻链的氨基酸序列与SEQ ID NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。在具体的非限制性实例中,重链的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:7组成;和/或轻链的氨基酸序列包括或由SEQ ID NO:9组成。

[0244] 在一些实施方案中,单克隆抗体或抗原结合片段是嵌合的或合成的抗体或抗原结合片段。

[0245] 本文还提供了融合蛋白,其包括本文公开的单克隆抗体或抗原结合片段和异源蛋

白或肽。在一些实施方案中,异源蛋白是Fc蛋白。在一些实例中,Fc蛋白是小鼠Fc或人Fc蛋白。

[0246] 进一步提供了包括本文公开的单克隆抗体或抗原结合片段和可检测标签(例如但不限于荧光团、酶或放射性同位素)的抗体偶联物。

[0247] 还提供了包括药学上可接受的载体和本文公开的单克隆抗体或抗原结合片段的组合物。

[0248] 还提供了编码本文公开的单克隆抗体或抗原结合片段的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。在一些实例中,核酸分子包括SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和/或SEQ ID NO:24的核苷酸序列。在具体的非限制性实例中,核酸分子包括SEQ ID NO:11和/或SEQ ID NO:12。在一些实施方案中,核酸分子可操作地连接至启动子。进一步提供了包括所描述的核酸分子的载体。还提供了包括本文公开的核酸分子或载体的细胞。

[0249] 进一步提供了检测样品中的FXII的方法。在一些实施方案中,该方法包括使样品与本文公开的单克隆抗体或抗原结合片段接触;并检测抗体与样品的结合。在一些实例中,单克隆抗体或抗原结合片段被直接标记。在其它实例中,该方法进一步包括使单克隆抗体或抗原结合片段与二级抗体接触,并检测二级抗体与单克隆抗体或抗原结合片段的结合。

[0250] 还提供了抑制包括FXII的样品中的FXII的活化和/或活性的体外方法。在一些实施方案中,该方法包括使样品与本文公开的FXII特异性抗体或抗原结合片段接触。在特定的实例中,样品包括血液或血浆样品。在一些实例中,该方法是抑制FXIIa的活性的方法。

[0251] 进一步提供了抑制受试者中FXII的活化和/或活性的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体或抗原结合片段。还提供了治疗涉及受试者中FXII的活性和/或活化的病理过程的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体或抗原结合片段。进一步提供了抑制涉及受试者中FXII的活化和/或活性的血栓形成的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体或抗原结合片段。在一些实例中,该方法包括抑制FXIIa的活性。

[0252] 在这些方法的一些实施方案中,受试者患有或有风险发展细菌感染、真菌感染、病毒感染、寄生虫感染、缺血性器官疾病、微血管血栓形成、大血管血栓形成、血栓栓塞、弥散性血管内凝血、严重的全身炎症反应综合征、涉及FXIIa活性的过敏或炎症反应、急性呼吸窘迫综合征、癌症、羊水栓塞、创伤、移植排斥、镰状细胞病、自身免疫性疾病,或已接受医疗设备植入。在一些实例中,缺血性器官疾病是心肌梗死或缺血性中风。在一些实例中,癌症是非转移性实体瘤癌症、转移性实体瘤癌症或白血病。在一些实例中,医疗设备植入是植入导管、心脏瓣膜、支架或移植物。在一些实例中,该方法进一步包括向受试者施用有效量的第二抗凝剂治疗,或抗血栓形成或溶栓治疗。

[0253] 在所公开方法的一些实施方案中,单克隆抗体或抗原结合片段通过肠胃外给药来施用。在一些实施方案中,以约0.1mg/kg至约2g/kg,或约0.1mg/kg至约20mg/kg,例如约0.5mg/kg至约10mg/kg,或约1mg/kg至约5mg/kg的剂量施用单克隆抗体或抗原结合片段。在一些实例中,以约0.1、约0.25、约0.5、约0.75、约1.0、约2.5、约5.0、约7.5、约10、约12.5、约

15、约17.5、约20mg/kg、约50mg/kg、约75mg/kg、约100mg/kg、约200mg/kg、约500mg/kg、约1000mg/kg或约2g/kg的剂量施用单克隆抗体或抗原结合片段。

[0254] 本公开进一步提供了试剂盒,其包括公开的单克隆抗体、抗原结合片段、融合蛋白、抗体偶联物、组合物、核酸分子、载体或分离的细胞。该试剂盒可进一步包括例如说明材料、缓冲液、细胞培养基、药学上可接受的载体或稀释剂等。

[0255] IV. 抗体偶联物

[0256] 本文提供了抗体偶联物,其包括本文公开的与试剂(例如可检测标签)偶联的单克隆抗体或抗原结合片段。出于诊断和治疗目的,试剂可以与本文公开的抗体或抗原结合片段连接或共价结合。这样的分子或部分可以是但不限于效应分子或报告分子。报告分子被定义为任何可以通过分析检测到的部分。已经与抗体偶联的报告分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标签、磷光分子、化学发光分子、生色团、发光分子、光亲和分子、带色粒子或配体,例如生物素。

[0257] 抗体偶联物的某些实例是其中抗体与可检测标签连接的那些偶联物。可检测标签是由于其特定的功能特性和/或化学特性而可被检测到的化合物和/或元素,其使用使得与它们附着的抗体被检测到和/或在需要时进一步量化。

[0258] 抗体偶联物可用作诊断试剂。抗体诊断通常分为两类,一类用于体外诊断,例如用于各种免疫分析中,和/或用于体内诊断方案的一类,通常称为“抗体导向成像”。

[0259] 本领域已知许多合适的显像剂,以及将其附着到抗体的方法(参见,例如,美国专利号5,021,236;4,938,948;和4,472,509,每个被援引加入本文)。成像部分可以是例如顺磁离子;放射性同位素;荧光染料;或NMR可检测的物质。

[0260] 示例性顺磁离子包括但不限于铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、钆(II)和/或钆(III)。在其它情况下(例如X射线成像)有用的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)和铋(III)。

[0261] 用于治疗 and/或诊断应用的示例性放射性同位素包括但不限于<sup>35</sup>S、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>19</sup>F、<sup>99m</sup>Tc、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In和<sup>125</sup>I。放射性标记的单克隆抗体可以根据本领域众所周知的方法产生。例如,单克隆抗体可以通过与碘化钠和/或碘化钾以及化学氧化剂(例如次氯酸钠)或酶促氧化剂(例如乳过氧化物酶)接触而被碘化。单克隆抗体可以通过配体交换过程用<sup>99m</sup>Tc标记,例如,通过用亚锡溶液还原高锝酸盐,将还原的锝螯合到SEPHADEX™柱上并将抗体应用于该柱。可替代地,可以使用直接标记技术,例如,通过孵育高锝酸盐、还原剂(例如SNC1<sub>2</sub>)、缓冲溶液(例如邻苯二甲酸钠钾溶液)和抗体。通常用于将以金属离子形式存在的放射性同位素结合到抗体上的中间官能团是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0262] 在预期用作偶联物的荧光标记中包括(但不限于)Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、级联蓝(Cascade Blue)、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、太平洋蓝(Pacific Blue)、REG、罗丹明绿(Rhodamine Green)、罗丹明红(Rhodamine Red)、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明(Tetramethylrhodamine)和/或德克萨斯红(Texas Red)。

[0263] 预期的其它类型的抗体偶联物是主要用于体外的那些,其中抗体连接到二级结合配体和/或酶(酶标签),该酶在与显色底物接触时将产生有色产物。合适的酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或葡萄糖氧化酶。二级结合配体包括生物素和/或亲和素和链霉亲和素化合物。这样的标签的使用是本领域技术人员众所周知的,并且例如在美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241中进行了描述;每个被援引加入本文。

[0264] 含有叠氮基团的分子也可用于通过低强度紫外线产生的反应性氮烯中间体与蛋白质形成共价键(Potter&Haley,1983)。特别是,嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮基类似物已被用作定点光探针,以鉴定粗细胞提取物中的核苷酸结合蛋白(Owens&Haley,1987;Atherton et al.,1985)。2-和8-叠氮基核苷酸也已经用于确定纯化蛋白的核苷酸结合结构域(Khatoun et al.,1989and Dholakia et al.,1989),并且可用作抗体结合剂。

[0265] 用于将抗体附着或偶联到其偶联物部分的几种方法在本领域中是已知的。一些附着方法涉及使用金属螯合物,所述金属螯合物采用例如,如美国专利号4,472,509和4,938,948中所述的有机螯合剂(每个被援引加入本文)。单克隆抗体也可以在偶联剂(例如戊二醛或高碘酸盐)存在下与酶反应。在这些偶联剂的存在下或通过异硫氰酸盐反应来制备具有荧光素标志物的偶联物。在美国专利号4,938,948中,使用单克隆抗体实现了乳腺肿瘤的成像,并且使用接头(例如methyl-p-hydroxybenzimidate或N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionate)将可检测的成像部分结合到抗体。

[0266] 在其它实施方案中,预期通过使用不改变抗体结合位点的反应条件在免疫球蛋白的Fc区中选择性引入巯基来衍生免疫球蛋白。公开了根据该方法产生的抗体偶联物以显示提高的寿命、特异性和敏感性(美国专利号5,196,066,被援引加入本文)。文献中还公开了效应分子或报告分子的位点特异性附着,其中报告分子或效应分子与Fc区域中的碳水化合物残基偶联。据报道,该方法产生了有诊断和治疗前景的抗体,目前正在临床评估中。

[0267] 在另一实施方案中,可以选择修饰免疫球蛋白以提高其在体内的稳定性和半衰期。PEG化是一个这样的过程,其涉及将聚乙二醇(PEG)聚合物链共价结合到抗体。PEG化常规是通过将PEG的反应性衍生物与靶分子一起孵育来实现的。PEG的共价结合可以“掩盖”来自宿主免疫系统的抗体(降低的免疫原性和抗原性),并增加试剂的流体动力学大小(溶液中的大小),从而通过降低肾清除率而延长其循环时间。PEG化也可以提供水溶性。用于修饰抗体的其它聚合物包括聚乙烯亚胺和聚赖氨酸,通常通过琥珀酸基团连接。

#### [0268] V. 免疫检测方法

[0269] 在更进一步的实施方案中,提供了用于结合、纯化、去除、定量和/或在其它方面通常检测生物组分的免疫检测方法,其使用与这样的组分发生免疫反应的抗体。一些免疫检测方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定和蛋白质印迹(Western blot)等。各种有用的免疫检测方法的步骤是本领域众所周知的,并且可以由本领域普通技术人员容易地进行。

[0270] 通常,免疫结合方法包括获得含有目的靶标的样品,并使样品与一级抗体接触,所述一级抗体在有效形成免疫复合物的条件下与靶标发生免疫反应。然后可以使用多种不同形式来评估抗体与靶标的结合。

[0271] 在一种形式中,抗体可以连接至固体支持物,例如以柱状基质的形式,并且将怀疑

含有靶标的样品应用于固定的抗体。从柱上洗去不需要的成分,使得免疫复合到固定的抗体上的靶标被洗脱下来。

[0272] 免疫结合方法还包括用于检测和定量样品中靶标的量以及检测和定量在结合过程中形成的任何免疫复合物的方法。在这里,将获得怀疑含有靶标的样品,并使样品与针对靶标的抗体接触,然后检测并定量在特定条件下形成的免疫复合物的数量。

[0273] 就抗原检测而言,所分析的生物样品可以是怀疑含有靶标的任何样品,例如,体液,如血液、血清、血浆、粘液、尿液、唾液、眼泪或精液。或者,可以使用组织。在有效条件下并在足以允许形成免疫复合物(一级免疫复合物)的时间段内使选定的生物样品与抗体接触通常是简单地将抗体组合物加入到样品中并将混合物孵育足以使抗体与存在的抗体形成免疫复合物(以结合至与抗体发生免疫反应的靶标)的时间。在这段时间之后,通常将洗涤样品-抗体组合物,例如组织切片、ELISA板、斑点印迹或蛋白质印迹,以去除任何非特异性结合的种类,从而仅使特异性结合在一级免疫复合物中的那些分子被检测到。

[0274] 通常,免疫复合物形成的检测是本领域众所周知的,并且可以通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于标记或标志物的检测,例如那些放射性、荧光、生物和酶促标签中的任何一种。关于使用这样的标记的美国专利包括美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241,每个被援引加入本文。然而,如本领域已知的,还可以使用二级结合配体,例如二级抗体和/或生物素/亲和素配体结合安排。

[0275] 用于检测的抗体本身可以连接至可检测的标签,其中然后可以简单地检测该标签,从而允许确定组合物中一级免疫复合物的量。或者,可以通过对抗体具有结合亲和力的二级结合配体来检测在一级免疫复合物中结合的一级抗体。在这些情况下,二级结合配体可以连接至可检测的标签。二级结合配体本身通常是抗体,因此可以称为“二级”抗体。在有效条件下并在足以允许形成二级免疫复合物的时间段内,使一级免疫复合物与标记的二级结合配体或抗体接触。然后通常洗涤二级免疫复合物以去除任何非特异性结合的标记的二级抗体或配体,然后检测二级免疫复合物中的剩余标签。

[0276] 进一步的方法包括通过两步法检测一级免疫复合物。如上所述,对抗体具有结合亲和力的二级结合配体(例如抗体)用于形成二级免疫复合物。洗涤后,再次在有效条件下并在足以允许形成免疫复合物(三级免疫复合物)的时间段内,使二级免疫复合物与对二级抗体具有结合亲和力的三级结合配体或抗体接触。三级配体或抗体连接至可检测的标记,允许检测由此形成的三级免疫复合物。如果需要,该系统可以提供信号放大。

[0277] Charles Cantor设计的一种免疫检测方法使用两种不同的抗体。第一步使用生物素化的单克隆或多克隆抗体检测靶抗原,然后第二步使用抗体检测与复合的生物素附着的生物素。在该方法中,首先将待测样品在含有第一步抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原,则一些抗体结合至抗原形成生物素化的抗体/抗原复合物。然后通过链霉亲和素(或亲和素)、生物素化的DNA和/或互补的生物素化的DNA的连续溶液中孵育来扩增抗体/抗原复合物,每一步向抗体/抗原复合物添加另外的生物素位点。重复扩增步骤,直到达到合适的扩增水平,此时将样品在含有抗生物素第二步抗体的溶液中孵育。第二步抗体被标记,例如用酶进行标记,该酶可用于通过组织酶学使用色原底物来检测抗体/抗原复合物的存在。通过适当的扩增,可以产生宏观可见的偶联物。

[0278] 另一种已知的免疫检测方法利用了免疫PCR方法。在与生物素化的DNA孵育之前,

PCR方法与Cantor方法相似,但是,不使用多轮链霉亲和素和生物素化的DNA孵育,而是用释放抗体的低pH或高盐缓冲液洗涤DNA/生物素/链霉亲和素/抗体复合物。然后将得到的洗涤溶液用于在合适的对照下与合适的引物进行PCR反应。PCR的巨大扩增能力和特异性可用于检测单个抗原分子。

[0279] 另一种固定有抗原的ELISA涉及在检测中使用抗体竞争。在该ELISA中,将针对抗原的标记的抗体添加到孔中,使其结合和/或通过其标签进行检测。然后通过在与涂覆的孔孵育期间将样品与针对抗原的标记的抗体混合,来确定未知样品中抗原的量。样品中抗原的存在可减少针对可用于结合到孔的抗原的抗体的量,从而降低最终信号。这也适用于检测未知样品中针对抗原的抗体,其中未标记的抗体与抗原涂覆的孔结合,并且还减少可用于结合标记的抗体的抗原的量。

[0280] ELISA通常具有某些共同的特征,例如包被、孵育和结合、洗涤以去除非特异性结合的种类以及检测结合的免疫复合物。在用抗原或抗体包被板时,通常要用抗原或抗体溶液孵育板上的孔过夜或一段特定的时间。然后洗涤板上的孔以去除不完全吸附的材料。然后用非特异性蛋白质“包被”孔的任何剩余可用表面,该蛋白质相对于试验抗血清是抗原中性的。这些包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉溶液。该包被允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点,从而降低由抗血清非特异性结合到表面上引起的背景。

[0281] 在许多ELISA中,使用二级或三级检测,而不是一直接过程。因此,在蛋白质或抗体结合到孔上、用非反应性材料包被以降低背景、并洗涤以去除未结合的材料之后,在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下使固定表面与待测生物样品接触。然后,免疫复合物的检测需要标记的二级结合配体或抗体,以及与标记的三级抗体或三级结合配体偶联的二级结合配体或抗体。

[0282] “在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下”是指该条件可包括用溶液(例如BSA、牛丙种球蛋白(BGG)或磷酸缓冲盐溶液(PBS)/Tween)稀释抗原和/或抗体。这些添加的试剂还有助于降低非特异性背景。

[0283] “合适的”条件还指在足以允许有效结合的温度或一段时间下进行孵育。在一些实例中,孵育步骤是从约1至约4小时和在约25℃至约27℃的温度下,或在约4℃下过夜。

#### [0284] VI. 抗体纯化

[0285] 在一些实施方案中,可以纯化抗FXII的抗体。如本文所使用的,术语“纯化的”旨在指可与其它成分分离的组合物,其中蛋白质相对于其天然可获得的状态被纯化至任何程度。因此,纯化的蛋白质也指不受其天然存在环境影响的蛋白质。当使用术语“基本上纯化的”时,该名称将指其中蛋白质或肽形成组合物的主要成分的组合物,例如构成组合物中约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多蛋白质。

[0286] 蛋白质纯化技术是本领域技术人员众所周知的。这些技术在一个层面上涉及将细胞环境粗分级为多肽和非多肽部分。将多肽与其它蛋白质分离后,可以使用色谱和电泳技术进一步纯化目标多肽,以实现部分或完全纯化(或纯化至均质)。

[0287] 特别适合于制备纯肽的分析方法是离子交换色谱法、排阻色谱法;聚丙烯酰胺凝胶电泳;等电聚焦。用于蛋白质纯化的其它方法包括用硫酸铵、PEG、抗体等沉淀或通过热变性沉淀,然后离心、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和层析;以及此类和其它技术的组合。

[0288] 在纯化抗FXII的抗体时,可能希望在原核或真核表达系统中表达多肽并使用变性

条件提取蛋白质。可以使用亲和柱将多肽从其它细胞成分中纯化出来,该亲和柱与多肽的标签部分结合。如本领域通常已知的,据信可以改变进行各种纯化步骤的顺序,或者可以省略某些步骤,并且仍然导致制备基本上纯化的蛋白质或肽的合适方法。

[0289] 通常,完整的抗体是利用结合抗体Fc部分的试剂(例如蛋白A)进行分级的。或者,可以使用抗原同时纯化和选择合适的抗体。这样的方法通常利用结合到支持物(例如柱、滤膜或珠子)上的选择剂。抗体与支持物结合,污染物被去除,并且通过施加特定条件(例如盐、热等)抗体被释放。

[0290] 根据本公开,用于定量蛋白质或肽的纯度的多种方法对于本领域技术人员而言将是已知的。这些包括,例如,确定活性级分的比活性,或通过SDS/PAGE分析来评估级分内的多肽数目。用于评估级分纯度的另一种方法是计算级分的比活性,将其与初始提取物的比活性进行比较,从而计算纯度。当然,用于表示活性量的实际单位将取决于选择用于纯化的特定测定技术以及表达的蛋白质或肽是否表现出可检测的活性。已知多肽的迁移可以随着SDS/PAGE的不同条件而变化,有时显著变化。因此,应当理解,在不同的电泳条件下,纯化或部分纯化的表达产物的表观分子量可以变化。

[0291] VII. 药物组合物

[0292] 药物组合物可以包括有效量的一种或多种溶解或分散在药学上可接受的载体中的抗体、治疗剂或其它试剂。水性组合物包括有效量的溶解或分散在药学上可接受的载体或水性介质中的抗体。术语“药学上可接受的”、“治疗上可接受的”等是指当施用于动物或人时(视情况而定)不会产生不利、过敏或其它不良反应的分子实体和组合物。

[0293] 术语“药学上可接受的载体”和“治疗上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等材料及其组合,如本领域普通技术人员已知的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, 被援引加入本文)。这样的介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗组合物中。补充活性成分也可以加入组合物中。对于人类给药,制剂应符合无菌性、热原性以及一般安全性和纯度标准。

[0294] 在适当的情况下,应该对生物材料进行广泛透析以去除不需要的小分子量分子,和/或冻干以便更容易地配制成所需的载体。然后通常将活性化合物配制用于肠胃外给药,例如配制用于通过静脉内、肌肉内、皮下、鼻内、肺内、鞘内或腹膜内途径进行注射或其它方式。通常,这样的组合物可以制备成注射剂,或作为液体溶液或悬浮液;还可以制备适用于在注射前添加液体后用于制备溶液或悬浮液的固体形式;并且制剂也可以被乳化。

[0295] 适用于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散体;配方包括芝麻油、花生油或水性丙二醇;以及用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉剂。在所有情况下,形式必须是无菌的,并且必须具有一定程度的流动性以易于注射,或气雾剂递送存在。可以将其加入设计用于延长释放的其它药物递送载体中,或进行修饰以具有延长的生物半衰期。它必须在制造和储存条件下保持稳定,并且必须进行防腐以防微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0296] 活性化合物的游离碱或药理学上可接受的盐的溶液可以在水中适当地与表面活

性剂(例如羟丙基纤维素)混合而制备。分散体也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物和油中制备。在常规的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0297] 抗FXII的抗体可以配制成游离碱、中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸式盐(与蛋白质的游离氨基形成),且其与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱(例如钠、钾、铵、钙或氢氧化铁)和有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0298] 载体也可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油。可以例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过保持分散情况下的期望粒径以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来预防微生物的作用。在许多情况下,可以包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以使可注射组合物的吸收延长。

[0299] 通过将所需量的活性化合物与上面列举的各种其它成分(根据需要)加入适当的溶剂中然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分加入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体包含基本分散介质和来自上面列举的那些中的所需的其它成分。至于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,制备方法为真空干燥和冷冻干燥技术,从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何另外所需成分的粉末。还预期制备更多或高度浓缩的溶液用于直接注射,其中设想使用DMSO作为溶剂以产生极快速的渗透,将高浓度的活性剂输送到较小的区域。

[0300] 配制后,将以与剂型相容的方式和治疗有效的这样的量施用溶液。制剂易于以多种剂型施用,例如上述可注射溶液的类型,但是也可以采用药物释放胶囊等。

[0301] 例如,对于水溶液中的肠胃外给药,如果必要的话,应适当缓冲溶液,并且首先使液体稀释剂与足够的生理盐水或葡萄糖等渗。这些特定的水溶液特别适合于静脉内、肌肉内、皮下、鼻内和腹膜内给药。就此而言,根据本公开,本领域技术人员将知道可以使用的无菌水介质。例如,一个剂量可以溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并且添加到100ml皮下注射液中或在建议的输注部位注射(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>th</sup> Ed. Mack Printing Company, pages 1035-1038 and 1570-1580, 1975)。根据所治疗的受试者的状况,剂量必然会发生一些变化。负责给药的人将确定用于个体受试者的合适剂量。

[0302] 除了配制用于肠胃外给药(例如静脉内或肌肉内注射)的化合物外,其它药学上可接受的形式包括,例如,片剂或其它用于口服的固体;脂质体制剂;延时释放胶囊;以及目前使用的任何其它形式,包括乳膏。

[0303] 治疗剂可以包括不同类型的载体,这取决于它是以固体、液体还是气雾剂形式施用,以及对于例如注射等施用途径是否需要无菌。抗FXII的抗体可以静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、肌肉内、皮下、结膜下、囊内(intravesiculary)、黏膜(mucosally)、心包内(intrapericardially)、脐内(intraumbilically)、眼内(intraocularly)、口服、局部、通过吸入(例如气雾剂吸入)、通过注射、通过输注、通过持续输注、局部灌注、直接浸浴靶细胞(bathing target cells directly)、通过导管、通过灌注、在乳膏中、在脂质组合物(例如脂质体)中、或通过本领域普通技术人员已知的其它方法或前述的任何组合来施用(参

见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed.Mack Printing Company,1990,被援引加入本文)。

[0304] 向动物或人类患者施用的组合物的实际剂量可以由物理和生理因素确定,例如体重、病症的严重程度、所治疗疾病的类型、先前或同时的治疗干预、患者的特发病和施用途径。负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度和个体受试者的合适剂量。

[0305] 在一些实施方案中,药物组合物可以包括例如至少约0.1%的活性化合物。在其它实施方案中,活性化合物可以包括例如单位重量的约2%至约75%,或约25%至约60%,以及可在其中衍生的任何范围。

[0306] 在一些实施方案中,组合物包括各种抗氧化剂以阻止一种或多种组分的氧化。在组合物为液体形式的实施方案中,载体可以是溶剂或分散介质,其包括但不限于水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、脂质(例如甘油三酯、植物油、脂质体)及其组合。可以例如通过使用包衣,例如卵磷脂;通过分散在载体(例如液体多元醇或脂质)中来维持所需的粒径;通过使用表面活性剂,例如羟丙基纤维素;或其组合来维持适当的流动性。在许多情况下,可以包括等渗剂,例如糖、氯化钠或其组合。

[0307] 在特定的实施方案中,可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝、明胶或其组合)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0308] 考虑到因子XII缺乏在人和动物(例如小鼠)中是无症状的,因此本公开的抑制FXII活性的抗体本质上是安全的。这是相对于使用其它抗凝抗体的重大进展,因为除本文讨论的那些以外(抑制FXII的接触活化的那些以外)的抗体,无论其施用途径或剂量如何,均预期引起出血性疾病。考虑到因子XII不参与重要的止血,因此类似于本文公开的那些的抗体将不会对止血产生此类不利影响。实际上,剂量过量的危险理论上为零,因为它在其目标饱和度之上没有另外的影响。因此,本申请的抗体是安全的抗血栓形成剂(抗凝剂、血液稀释剂)。

[0309] 药物组合物可以肠胃外施用给患有其中FXII活化带来问题的疾病的受试者。组合物可以作为弹丸(bolus)或通过持续输注施用给有需要的患者。例如,抗体或抗体片段的弹丸施用的量可以为0.0025至100mg/kg体重、0.025至0.25mg/kg、0.010至0.10mg/kg或0.10至0.50mg/kg。对于持续输注,可以按0.001至100mg/kg体重/分钟、0.0125至1.25mg/kg/min、0.010至0.75mg/kg/min、0.010至1.0mg/kg/min或0.10至0.50mg/kg/min施用作为Fab片段存在的本发明的抗体持续1-24小时、1-12小时、2-12小时、6-12小时、2-8小时或1-2小时。可以通过弹丸注射来施用抗体,根据剂量,每小时、每天、每周或每月重复。施用的频率和持续时间将取决于病症的严重程度和持续治疗活性的需要,而没有限制。频率也可以从每周三次到每两周到六个月一次不等。

[0310] 此外,可以通过皮下、静脉内或肌肉内注射将组合物施用于患者。例如,可以每天、每周、每两周或每月通过皮下注射向患者施用10至100mg剂量的抗FXII抗体。

[0311] 本公开的抗体可以用作单一疗法,但是可以与其它疗法联合。例如,共同施用一种或多种另外的抗血栓形成剂或抗炎剂,例如非甾体抗炎药(NSAID)、血小板抑制剂、抗凝剂或溶栓剂,被认为对治疗某些疾病是有用的。这些联合疗法有可能减少抗凝血或抗炎药的必要频率或剂量。共同施用或联合疗法是指分别配制或共同配制在一种组合物中的两种治疗药物的施用,并且当分别配制时,在大约相同的时间或在不同的时间但在相同的治疗周

期内施用。

[0312] 联合使用的抗血小板药物包括不可逆的环氧合酶抑制剂(阿司匹林)、二磷酸腺苷(ADP)受体抑制剂(氯吡格雷、普拉格雷、替卡格雷和噻氯匹定)、磷酸二酯酶抑制剂(西洛他唑)、糖蛋白IIB/IIIA抑制剂(阿昔单抗、依替巴肽和替罗非班)、腺苷再摄取抑制剂(双嘧达莫)和血栓素抑制剂,例如血栓素合成酶抑制剂(伊非曲班)、血栓素受体拮抗剂(塞曲司特、吡考他胺)和特鲁曲班。

[0313] 联合使用的抗凝药物包括维生素K拮抗剂(华法林)、普通和低分子量肝素(依诺肝素、达肝素、肝素)、凝血酶抑制剂(比伐卢定、阿加曲班、达比加群、抗凝血酶III)和因子Xa抑制剂(阿哌沙班、磺达肝素、利伐沙班、依多沙班)。

[0314] 联合使用的纤维蛋白溶解剂包括阿尼普酶、瑞替普酶、链激酶、kabikinase、阿替普酶、替奈普酶、尿激酶、葡激酶、纤溶酶和rokinase。

[0315] 联合使用的抗炎药包括NSAID,例如塞来昔布、吡罗昔康、吲哚美辛、美洛昔康、酮洛芬、舒林酸、阿司匹林、二氟尼柳、萘丁美酮,以及皮质类固醇,例如强的松、倍他米松、可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙和强的松龙。这些还可以包括补体系统或激肽释放酶-激肽系统的抑制剂。

[0316] VIII. 试剂盒

[0317] 本文所述的任何组合物可以包括在试剂盒中。因此,试剂盒将在合适的容器中包括抗体(或抗原结合片段)和/或另外的试剂。其它组件可以包括在试剂盒中。诊断和治疗试剂盒在合适的容器中包括药学上可接受的制剂形式的抗体的药学上可接受的制剂。试剂盒可以具有单个容器,和/或针对每种化合物可以具有不同的容器。

[0318] 当试剂盒的组分以一种和/或多种液体溶液提供时,液体溶液可以是水溶液,其中无菌水溶液是特定实施方案的一个实例。抗体也可以配制成可注射的组合物,在这种情况下,容器本身可以是注射器、移液管和/或其它类似装置,从中可以将制剂应用于身体的感染区域、注射到动物中和/或甚至应用于试剂盒的其它组分和/或与试剂盒的其它组分混合。

[0319] 但是,试剂盒的组件可以作为干粉提供。当试剂和/或组分作为干粉提供时,粉末可以通过添加合适的溶剂来重建。设想溶剂也可以在另一个容器中提供。

[0320] 容器通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器和/或其它容器,抗体/抗体制剂放置在其中,并适当分配。试剂盒还可以包括用于容纳无菌的、药学上可接受的缓冲液和/或另一稀释剂的第二容器。

[0321] 试剂盒还可以包括用于将小瓶密闭地容纳以供商业销售的装置,例如,将所需小瓶保留在其中的注射和/或吹塑塑料容器。

[0322] 无论容器的数量和/或类型如何,试剂盒还可以包括和/或包装有用于协助最终抗体在动物体内注射/施用和/或放置的器械。这样的器械可以是注射器、移液管、镊子和/或任何这样的医学上认可的运载工具。

[0323] IX. 治疗用途

[0324] 考虑到FXII缺乏在人和小鼠中是无症状的,因此本公开的防止FXII活性的抗体本质上是安全的。这是相对于使用其它抗凝抗体的重大进展,因为除本文公开的那些以外的抗体,无论其施用途径或剂量如何,均预期引起出血性疾病。考虑到FXII不参与重要的止

血,因此类似于本文公开的那些的抗体不会对止血产生此类不利影响。实际上,过量的危险理论上为零,因为它在其目标饱和度之上没有另外的影响。因此,本公开的抗体是安全的抗血栓形成剂(抗凝剂、血液稀释剂)和安全的抗炎分子。

#### [0325] A. 血栓形成和血栓栓塞

[0326] 血栓形成是血管内形成血凝块,阻碍血液通过循环系统的流动。当血管受到损伤时,身体利用血小板(凝血细胞)和纤维蛋白形成血凝块来防止失血。即使当血管没有受到损伤,在某些情况下也可能在体内形成血凝块。冲破限制并开始移动的凝块被称为栓塞物。当血栓占动脉管腔横截面积的75%以上时,由于氧气减少(缺氧)和代谢产物(如乳酸)的积累,供应到组织的血流减少到足以引起症状。超过90%的梗阻可导致缺氧、氧气完全耗尽和梗死(细胞死亡方式)。血栓栓塞是血栓形成及其主要并发症(栓塞)的综合表现。

[0327] 血栓形成有两种不同的形式,静脉血栓形成和动脉血栓形成,每一种都可以由几种亚型来表现。静脉血栓形成是在静脉内形成血栓(血凝块)。有几种疾病可以归为这一类。

[0328] 深静脉血栓形成(DVT)是在深静脉内形成血凝块。它最常见地影响腿部静脉,例如股静脉。在深静脉内形成血凝块有三个重要因素:血流速度、血液厚度和血管壁质量。DVT的典型体征包括受影响区域的肿胀、疼痛和发红。

[0329] 门静脉血栓形成是影响肝门静脉的静脉血栓形成形式,可导致门静脉高压和肝脏供血减少。它通常具有例如胰腺炎、肝硬化、憩室炎或胆管癌的病理原因。

[0330] 肾静脉血栓形成是由血栓阻塞肾静脉。这往往导致肾脏引流减少。抗凝疗法是首选的治疗。

[0331] 颈静脉血栓形成可能是由于感染、静脉注射药物使用或恶性肿瘤而发生的病症。颈静脉血栓形成可能有多种并发症,包括:全身性败血症、肺栓塞和视神经乳头水肿。虽然以静脉部位剧烈疼痛为特征,但由于它可以随机发生,因此它证明很难诊断。

[0332] Budd-Chiari综合征是肝静脉或下腔静脉阻塞。这种形式的血栓形成表现为腹痛、腹水和肝肿大。处理在治疗和通过使用分流术的手术干预之间变动。

[0333] Paget-Schroetter疾病是由血栓阻塞上肢静脉(例如腋静脉或锁骨下静脉)。这种情况通常在剧烈运动后出现,通常出现在年轻的健康人群中。男性比女性受影响更大。

[0334] 脑静脉窦血栓形成(CVST)是罕见的中风形式,是由血栓阻塞硬脑膜静脉窦引起的。症状可能包括头痛、视力异常、中风的任何症状(例如身体一侧的面部和肢体无力)和癫痫。诊断通常通过CT或MRI扫描进行。大多数受影响的人完全康复。死亡率为4.3%。

[0335] 动脉血栓形成是在动脉内形成血栓。在大多数情况下,动脉血栓形成在粥样斑块破裂之后发生,因此被称为动脉粥样硬化血栓形成(atherothrombosis)。动脉血栓形成的另一个常见原因是心房颤动,这会导致血液流动紊乱。此外,众所周知,心房颤动的直流电复律有很大的血栓栓塞风险,尤其是如果持续超过48小时。未接受抗凝治疗的病例中约有5%发生血栓栓塞。心脏电复律后血栓栓塞的机制和发病机理尚不完全清楚。动脉血栓形成可以栓塞并且是动脉栓塞的主要原因,可能导致体内几乎任何器官梗死。

[0336] 肝动脉血栓形成通常作为肝脏移植后的严重并发症发生。肢体也可能形成动脉栓塞。

[0337] 因此,可以安全地治疗血栓形成患者的实际出血,例如那些由于另一种药物或任何其它原因(遗传或后天获得)而出血。而且,可以安全地治疗与异物相关的热血形成,例如

与体外装置、氧合器、透析膜、导管、血管内物体(例如支架、移植物)相关的血栓形成,尤其是当其它药物被忌用时。

[0338] B. 弥散性血管内凝血或消耗性凝血病

[0339] 消耗性凝血病(CC),也称为弥散性血管内凝血(DIC)或弥散性血管内凝血病,是发生于对多种疾病的反应中的病理性的凝血(血液凝结)机制激活。DIC导致全身血管内形成小的血凝块。由于小凝块消耗凝血蛋白和血小板,因此正常的凝血受到破坏,并且皮肤(例如采集血样的部位)、胃肠道、呼吸道和手术伤口出现异常出血。小凝块还会干扰器官(例如肾脏)的正常血流,因此器官可能功能失常。

[0340] DIC可以急性发生,但也可以在较慢的慢性基础上发生,这取决于潜在的问题。它在危重症中很常见,并且可能参与多器官衰竭的发展,其可能导致死亡。

[0341] 在体内平衡状态下,身体维持在凝血和纤维蛋白溶解的精细平衡中。凝血级联反应的激活产生凝血酶,其将纤维蛋白原转化为纤维蛋白;稳定的纤维蛋白凝块是止血的最终产物。纤维蛋白溶解系统然后起作用以分解纤维蛋白原和纤维蛋白。纤维蛋白溶解系统的激活产生纤溶酶(在凝血酶存在下),其负责纤维蛋白凝块的溶解。纤维蛋白原和纤维蛋白的分解产生称为纤维蛋白降解产物(FDP)或纤维蛋白裂解产物(FSP)的多肽。在体内平衡状态下,纤溶酶的存在至关重要,因为它是凝血的主要蛋白水解酶,也是凝块分解或纤维蛋白溶解所必需的。

[0342] 在DIC中,凝血和纤维蛋白溶解过程失调,结果是广泛的凝血并导致出血。不管DIC的触发事件如何,一旦开始,DIC的病理生理学在所有情况下都是相似的。DIC的一个关键介质(mediator)是称为组织因子(TF)的跨膜糖蛋白的释放。TF存在于许多细胞类型(包括内皮细胞、巨噬细胞和单核细胞)的表面,通常不与一般循环(general circulation)接触,但在血管损伤后暴露于循环中。例如,TF是响应于暴露于细胞因子(特别是白细胞介素1)、肿瘤坏死因子和内毒素而释放的。这在败血症条件下DIC的发展中起主要作用。TF在肺、脑和胎盘组织中也很丰富。这有助于解释为什么DIC在广泛创伤患者中容易发展。激活后,TF与凝血因子结合,然后触发外源性途径(通过FVII),随后触发凝血的内源性途径(XII至XI至IX)。

[0343] 内毒素的释放是革兰氏阴性败血症引起DIC的机制。在急性早幼粒细胞白血病中,治疗引起白血病粒细胞前体的破坏,导致从其储存颗粒中释放出大量蛋白水解酶,引起微血管损伤。其它恶性肿瘤可能增强各种致癌基因的表达,导致TF和阻止纤维蛋白溶解的纤溶酶原激活剂抑制剂-1(PAI-1)的释放。

[0344] 循环中过量的凝血酶是由凝血级联反应的过度激活引起的。过量的凝血酶裂解纤维蛋白原,最终在循环中留下多个纤维蛋白凝块。这些过量的凝块捕获血小板聚以变成更大的凝块,从而导致微血管和大血管血栓形成。凝块在微循环、大血管和器官中的这种沉积是导致伴随DIC发生的缺血、炎症、器官灌注受损和终末器官损伤的原因。

[0345] 在该过程中还消耗了凝血抑制剂。降低的抑制剂水平将允许更多的凝结,从而形成了反馈系统,其中增加的凝结导致更多的凝结。同时,发生血小板减少,这归因于血小板的截留和消耗。在形成多个凝块时消耗凝血因子,这会导致DIC出现出血。

[0346] 同时,过量的循环凝血酶有助于纤溶酶原转化为纤溶酶,从而导致纤维蛋白溶解。凝块的分解导致过量的FDP,FDP具有强大的抗凝血特性,从而导致出血。过量的纤溶酶还激

活补体和激肽系统。这些系统的激活导致患有DIC的患者表现出许多临床症状,例如休克、低血压和血管通透性增加。急性形式的DIC被认为是血管内凝血过程的极端表现,其正常体内平衡边界被完全破坏。DIC与不良预后和高死亡率相关。

[0347] 然而,最近对DIC的病理生理学的基本假设和解释提出了挑战。在动物模型中对败血症和DIC的研究表明,肝细胞表面的高表达受体(称为Ashwell-Morell受体),可导致链球菌肺炎(SPN)和可能其它病原体引起的菌血症和败血症中的血小板减少。在SPN败血症中观察到的血小板减少并不是由于凝血因子(例如血小板)的消耗增加,而是由于这种受体的活性使肝细胞能够摄取并迅速清除循环中的血小板。通过在前血栓形成成分参与DIC的凝血障碍之前将其去除,Ashwell-Morell受体减轻DIC的严重程度,从而减少血栓形成和组织坏死,并提高存活。在DIC中以及缺乏该受体的一些组织中观察到的出血可能因此继发于血栓形成的增加和机械性血管屏障的丧失。这一发现对于发明新的方法来降低DIC的病理生理学具有可能重要的临床意义。

[0348] 唯一有效的治疗是逆转基本病因。抗凝剂的使用非常罕见,并且只有在血栓形成很可能导致即将死亡的情况下(例如在冠状动脉血栓形成或脑血管血栓形成中)。如果血小板计数低于 $5,000-10,000/\text{mm}^3$ 并且发生大出血,则可以输注血小板,并且可以尝试施用新鲜冷冻血浆以补充凝血因子和抗血栓形成因子,尽管这些只是暂时性措施,并且可能导致血栓形成的发展增加。

[0349] DIC导致纤维蛋白原水平降低(因为它已经全部转化为纤维蛋白),这可以在医院实验室进行检测。该检测适用于“纤维蛋白裂解产物”(FSP)或“纤维蛋白降解产物”(FDP),当纤维蛋白溶解而使血凝块溶解时,纤维蛋白发生降解时产生“纤维蛋白裂解产物”(FSP)或“纤维蛋白降解产物”(FDP)。在某些情况下,输注抗凝血酶可能是必要的。

### [0350] C. 创伤

[0351] 身体创伤是严重且会改变身体的身体损伤,例如肢体切除。钝性创伤,一种由钝物施加或施加于钝物的撞击或其它力引起的物理性创伤,而穿透性创伤是一种皮肤或组织被物体刺穿的物理性外伤。创伤也可以被描述为计划外的(例如事故)或有计划的(在手术的情况下)。两者均可表现为轻度至重度组织损伤、失血和/或休克,并且两者均可能导致随后的感染,包括败血症。本公开提供了创伤患者中出血的安全处理,包括预处理(在医疗程序的情况下)和创伤发生后的治疗。

[0352] 外科医生对患者使用操作性的手动和仪器技术来研究和/或治疗病理状况,例如疾病或损伤,以帮助改善身体功能或外观,或有时出于某些其它原因。本公开可以安全地解决由手术造成的创伤,包括围手术期和围介入性血栓预防,特别是在出血风险高的情况下。两个特别令人关注的领域是与神经系统和眼睛有关的手术。

[0353] 一般来说,当程序涉及切割患者的组织或闭合先前持续的伤口时,就被认为是手术。其它不一定属于这一范畴的程序,例如血管成形术或内窥镜检查,如果它们涉及常见的手术程序或设置,例如无菌环境的使用、麻醉、消毒条件、典型的手术器械、缝合或装订(stapling),则可被认为是手术。所有形式的手术均被认为是侵入性程序;所谓的无创手术通常是指不穿透要处理的结构的手术(例如,角膜的激光消融)或放射外科程序(例如肿瘤的照射)。手术可以持续几分钟到几小时。

[0354] 手术程序通常按紧迫性、程序类型、所涉及的身体系统、侵入程度和专用仪器进行

分类。择期手术是为了纠正不危及生命的状况,并应患者的要求进行,但要视外科医生和手术设备的可用性而定。紧急手术是为了挽救生命、肢体或功能能力而必须迅速进行的手术。探查手术是为了辅助或确认诊断而进行的。治疗性手术治疗先前诊断的状况。

[0355] 截肢涉及切掉身体的一部分,通常是肢体或手指/足趾。再植涉及重新接上切断的身体部分。重建手术涉及重建身体的受伤、残缺或变形的部分。整容手术是为了改善原本正常结构的外观。切除是从患者切除器官、组织或其它身体部分。移植手术是通过将来自不同人(或动物)的另一个器官或身体部分插入患者体内来替代器官或身体部分。从活的人或动物中取出器官或身体部分用于移植也是一种手术。

[0356] 当在一个器官系统或结构上进行手术时,可以按所涉及的器官、器官系统或组织进行分类。实例包括心脏手术(在心脏上进行)、胃肠手术(在消化道及其附属器官内进行)和骨科手术(在骨骼和/或肌肉上进行)。

[0357] 微创手术涉及较小的外切口以将微型器械插入体腔或结构内,如在腹腔镜手术或血管成形术中那样。相比之下,开放性手术程序需要较大的切口以进入目标区域。激光手术涉及使用激光切割组织来代替手术刀或类似的手术器械。显微手术涉及使用手术显微镜让外科医生看见小的结构。机器人手术利用手术机器人(例如达芬奇或宙斯手术系统)在外科医生的指导下控制器械。

[0358] 创伤性出血在损伤的广泛国际影响中占很大比例,造成了很大一部分死亡,并在受伤者中造成了很高的发病率。尽管在院前护理方面存在差异,但创伤性出血的急性治疗在世界范围内是相似的,并且遵循公认的已发布指南。重伤患者的护理分为四个通常是重叠的部分:复苏、手术和重症监护阶段。出血的诊断和控制是创伤护理的所有阶段都应该具有高优先级,并且对于出血性休克患者尤其重要。早期的出血控制尝试包括用定向压力、加压包扎或止血带直接控制可见的严重出血源;稳定长骨和骨盆骨折;并保持病人温暖。在复苏阶段,提供温热的静脉流体,在手术控制出血之前进行降压复苏以及适当输注血液和血液制品。在手术阶段,对出血和任何其它损伤进行手术控制,并提供另外的输血。最后,重症监护阶段提供术后支持和组织灌注。

[0359] D. 设备植入

[0360] 植入物是制造用于替换缺失的生物结构、支撑受损的生物结构或增强现有的生物结构的医疗设备。与移植物相比,医疗植入物是人造设备,而移植物是被移植的生物学组织。与身体接触的植入物表面可能由生物学材料制成,例如钛、硅或磷灰石,这取决于最需要的功能是什么。在某些情况下,植入物包含电子设备,例如人工起搏器和人工耳蜗。一些植入物具有生物活性,例如可植入丸剂或药物洗脱支架形式的皮下药物输送设备。

[0361] 最常见的医疗植入物类型是用于在骨折的骨头愈合时将其锚固的钉、棒、螺钉和板。更复杂的植入物包括人工关节,例如膝关节和髋关节、乳房植入物、人工心脏瓣膜、支架和导管。

[0362] E. 移植

[0363] 将器官从一个身体器官移植到另一个身体或从患者自身的供体部位移植的目的是替换受者的受损或缺失的器官。再生医学的新兴领域使科学家和工程师能够从患者的自身细胞(干细胞或从衰竭器官中提取的细胞)中再生出器官。在同一人体内移植的器官和/或组织称为自体移植。最近在同一物种的两个受试者之间进行的移植称为同种异体移植。

同种异体移植可以来自活体或尸体来源。

[0364] 通常可以移植的器官是心脏、肾脏、肝脏、肺、胰腺、肠和胸腺。组织包括骨骼、肌腱(均称为骨骼肌移植)、角膜、皮肤、心脏瓣膜和静脉。在世界范围内,肾脏是最常见的移植器官,其次是肝脏,然后是心脏。角膜和骨骼肌移植是最常见的移植组织;这些器官移植的数量超过10倍。

[0365] 器官捐献者可能活着,或者脑死亡。可以从心脏死亡的捐献者(停止心跳后多达24小时)中恢复组织。与器官不同,大多数组织(角膜除外)可以保存和储存长达五年,这意味着它们可以被“存储(banked)”。在美国,组织移植受美国食品和药物管理局(FDA)的监管,其对移植的安全性制定了严格的法规,主要目的是预防传染病的传播。法规包括捐献者筛选和测试的标准,以及对组织移植物的处理和分配的严格法规。器官移植不受FDA的监管。

[0366] 移植医学是现代医学中最具挑战性和最复杂的领域之一。除了移植排斥这一关键问题外,在手术部位凝结以及随后凝块转运到血管系统中引起的血栓形成是主要关注。

[0367] F. 癌症

[0368] 癌症患者的多样性凝血障碍是由肿瘤特异性生长特征、受损的内皮衬层的新生血管生成、骨髓细胞生成不良、低蛋白血症或伴有器官功能障碍的转移病灶生长引起的。最近的研究发现凝血障碍和肿瘤生长之间在临床上具有相关性。这些促使新的治疗策略集中于生长因子,目的是控制肿瘤转移,特别是如果用于治疗微转移性疾病。但是,这样的治疗可能导致危及生命的凝血失衡。

[0369] 实际上,某些癌症比正常细胞表达更多的血栓形成蛋白。这些蛋白质包括组织因子、胶原蛋白、层粘连蛋白、因子VII、XI和XII、纤溶酶原激活物抑制剂、抗凝血酶、玻连蛋白、纤连蛋白和纤维蛋白原。这些蛋白质可能会出现在癌细胞表面或可能被分泌,并可能引发癌症相关的血栓形成,这在癌症患者中非常常见。用本公开的抗体进行安全抗凝可以帮助一些止血效果不佳的癌症患者。

[0370] 非手术癌症治疗后,尤其是术前放疗后,凝血稳态可能进一步受损,这会产生损伤加剧出血和血栓形成。抗癌化学疗法可能影响肝功能,并降低促凝和抗凝因子的合成。大多数化疗方案影响血小板合成,这是主要的剂量限制性副作用。在联合全身化疗和局部抗肿瘤治疗中均观察到了这一点。尽管化疗产生的副作用是可逆的,但是在抗癌治疗后内皮损伤可能持续很多年。此外,一些患者在化疗期间血小板计数低,这些患者有出血的风险,但仍可能需要治疗血栓形成。

[0371] G. 中风和心肌梗死

[0372] 中风是由于大脑血液供应紊乱导致的大脑功能迅速衰退。这可能是由于缺血、血栓、栓塞物(滞留颗粒)或大出血(出血)。在血栓性中风中,通常在动脉粥样硬化斑块周围形成血栓(血凝块)。由于动脉的阻塞是逐渐的,有症状的血栓性中风的发病较慢。血栓性中风可分为两类:大血管疾病和小血管疾病。前者影响血管,例如颈内动脉、脊椎和脑底动脉环(Willis环)。后者可以影响较小的血管,例如脑底动脉环(Willis环)的分支。

[0373] 心肌梗死(MI)是由梗死(由于缺血导致的组织死亡)引起的,通常是由于血栓阻塞冠状动脉。如果不立即接受紧急医疗,MI可能很快致命。如果在最初发作(发作)的12小时内被诊断,则开始溶栓治疗。

[0374] H. 感染

[0375] 如果在血栓形成部位存在感染,血栓可能会分解,使被感染物质的颗粒散布在整个循环系统(脓毒症、败血症栓塞物)中,并在转移到任何地方时形成转移性脓肿。在没有感染的情况下,血栓可能会脱离并作为栓塞物进入循环,最终滞留并完全阻塞血管,除非迅速治疗,否则会在阻塞后的区域导致组织坏死(梗死)。如果阻塞在冠状动脉中,很可能发生心肌缺血,从而由于缺氧,心肌细胞不能正常工作。这种缺氧然后很可能导致心肌梗死。

#### [0376] I. 炎症

[0377] FXIIa的抑制有望减弱由接触活化支持的所有病理反应。例如,接触活化可以促进过敏反应、血管性水肿、肺部反应(例如哮喘)、皮肤反应、肠道反应、眼部反应、心血管反应(休克、水肿等)和全身性炎症反应综合征。FXIIa通过裂解血浆前激肽释放酶来产生激肽释放酶,激肽释放酶反过来裂解激肽原1并释放缓激肽。缓激肽是已知的最有效的炎症介质之一。因此,抑制FXIIa减弱了前激肽释放酶,从而减少缓激肽产生,并有望干扰涉及缓激肽途径的炎症反应和血管调节反应。由于接触活化也可以触发补体系统的活化,因此可以合理地预期FXII抑制会减少涉及补体系统的炎症反应。

#### [0378] J. 联合疗法

[0379] 本公开的抗体可以用作单一疗法,但是也可以与用于治疗FXII抑制剂预期治疗的疾病状况的其它疗法联合。例如,共同施用一种或多种另外的抗炎或抗血栓形成剂,例如NSAID、血小板抑制剂、抗凝剂或溶栓剂,被认为对治疗某些疾病是有用的。这些联合疗法有可能减少针对相同病理状况的其它药物的必要治疗频率或剂量。共同施用或联合疗法是指分别分别配制或共同配制在一种组合物中的治疗药物的施用,并且当分别配制时,在大约相同的时间或在不同的时间但在相同的治疗周期内施用。

[0380] 提供以下实施例以说明某些特定特征和/或实施方案。这些实施例不应被解释为将本公开限制为所描述的特定特征或实施方案。

#### [0381] 实施例

##### [0382] 实施例1:材料和方法

[0383] 本实施例描述了用于实施例2中所述研究的实验程序和材料。

##### [0384] 抗FXII单克隆抗体(MAb)的产生

[0385] 用重组人FXII免疫FXII缺陷的小鼠(Ivanov et al., Blood 2017;129:1527-1537),并通过标准方法产生杂交瘤。克隆5C12产生与FXII和FXIIa结合的抗体。将杂交瘤细胞亚克隆并扩增,使用标准程序纯化5C12,进行体外表征,然后用于体内实验。

##### [0386] 5C12的表征

[0387] 将FXII(40nM)(Haematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT)与0-80nM 5C12(10分钟)孵育,然后与1 $\mu$ g/ml硫酸葡聚糖孵育(20分钟)。然后加入Spectrozyme FXIIa(0.5mM)(Sekisui Diagnostics GmbH, Pfungstadt, Germany),以通过活化的FXII(FXIIa)测量水解作用。接下来,将FXII(100nM)和5C12(0-200nM)共同孵育(10分钟),然后用激肽原-1(HK, 12.5nM)、前激肽释放酶(PK, 12.5nM)(Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN)和短链或长链多磷酸盐(10 $\mu$ M) 50/50稀释(60分钟,终浓度)(Ivanov et al., Blood 2017;129:1527-1537)。加入聚凝胺(6 $\mu$ g/ml)和大豆胰蛋白酶抑制剂(50 $\mu$ g/ml)后,对酰胺水解活性进行定量。为了测试FXIIa抑制作用,将Spectrozyme FXIIa添加到FXIIa(20nM)和5C12(0-40nM)的混合物中。为了测试5C12(0-100nM)对FXII(100nM)活化的

影响,将玉米胰蛋白酶抑制剂(CTI,40 $\mu$ g/ml)、激肽释放酶(5nM)和硫酸葡聚糖(10 $\mu$ g/ml)共同孵育(0-60分钟)。通过还原SDS-PAGE来分离样品,并用抗FXII多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX)进行免疫印迹。

[0388] 体外膜肺氧合器中血栓形成的狒狒模型

[0389] 如前所述,使用带有长期外置股骨动静脉(AV)分流(shunt)的狒狒(n=3)(Gruber and Hanson, Blood 2003;102:953-955; Crosby et al., Arter Thromb Vasc Biol 2013; 33:1670-1678; Gruber et al., Thromb Res 2007;119:121-127)。简而言之,狒狒接受了<sup>111</sup>In标记的自体血小板和<sup>125</sup>I标记的同源纤维蛋白原,然后将它们的AV分流延伸以合并生理盐水处理过的(saline-primed)膜肺氧合器筒(membrane oxygenator cartridge)(Terumo-CAPIOX®RX05, Terumo Cardiovascular Group, Ann Arbor, MI),所述膜肺氧合器筒由AV压力梯度驱动的血流灌注,流速限制为0.1L/min。使用 $\gamma$ 相机成像(Xeleris 3.1软件接口的GE-Brivo NM 615, GE Healthcare, Chicago, IL)记录氧合器内的血小板放射性,并按照长期AV分流模型中的其它设备所述进行计算(Gruber and Hanson, Blood 2003; 102:953-955; Gruber et al., Thromb Res 2007;119:121-127; Hanson et al., J Clin Invest 1993;92:2003-2012; Tucker et al., Blood 2009;113:936-944)。在60分钟时,取出筒,漂洗,干燥,并冷藏贮存用于随后评估<sup>125</sup>I-纤维蛋白含量,如前所述(Gruber and Hanson, Blood 2003;102:953-955; Hanson et al., J Clin Invest 1993;92:2003-2012)。简而言之,在氧合器中充满消化缓冲液(10mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 35mM SDS)3天,以溶解所捕获的凝块,并使用 $\gamma$ 计数器(Wizard-3, PerkinElmer, Shelton, CT)测量放射性。

[0390] 狒狒的抗凝

[0391] 在剂量探索实验中,以40分钟的间隔静脉注射六次连续的1mg/kg剂量的5C12,并测量血浆样品的aPTT延长。发现5mg/kg的5C12对凝血产生接近饱和的作用。还确定了灌注前15分钟的低剂量肝素(20U/kg)使氧合器明显保持了某些可测量的实时血小板沉积,从而可以确定补充5C12抗凝后的任何变化。在两个氧合器灌注实验中,灌注氧合器而没有肝素化。在确定性实验中,评估了用肝素(20U/kg)、5C12(5mg/kg)或它们的组合预处理对氧合器筒中血小板滞留的影响。

[0392] 止血评估

[0393] 使用成人Surgicutt®设备(Instrumentation Laboratories, Bedford, MA)对原发性皮肤止血进行了评估。在每个实验期间记录两次出血时间(BT)。测量了BT测试期间的失血。观察皮肤伤口是否再次出血。由于凝血酶原时间(PT)的延长是止血受损最广泛使用和临床上重要的标志物,因此使用KC4血凝仪测量血浆凝血酶原时间。

[0394] 血液分析

[0395] 将血样收集到柠檬酸盐中,并使用SynthASil(Instrumentation Laboratory, Bedford, MA)和KC4™分析仪(TCoag, Ltd, Ireland)测量血浆aPTT。使用LupoTek KCT(r<sup>2</sup>-Diagnostics, South Bend, IN)确定血液的活化凝血时间(ACT)。血浆凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)和血小板因子4(PF4)分别使用来自Siemens(Marburg, Germany)和RnD Systems(Minneapolis, MN)的ELISA试剂盒进行测量。

[0396] 数据分析

[0397] 数值在文本中显示为平均值和范围,在图中显示平均值和SEM。使用GraphPad

Prism 5(GraphPad Software,San Diego,CA),通过单因素方差分析比较平均值以进行处理。通过重复测量值方差分析,使用SigmaPlot 11(Systat,Inc.,Chicago,IL)针对时间和处理,进行肝素和肝素+5C12结果随时间对血小板沉积速率的比较。对于平均值之间的差异,将 $<0.05$ 的概率视为具有统计学意义。

[0398] 实施例2:狒狒中对因子XII的抗体抑制减少体外膜肺氧合器中来自血液的血小板沉积

[0399] 该实施例描述了FXII特异性单克隆抗体5C12的特征及其作为抗凝剂和减少血小板积聚的能力。此外,使用灵长类动物模型,这些研究表明,在肝素化和非肝素化的狒狒中,FXII抑制均会降低血小板活化和膜肺氧合器内的沉积。

[0400] 5C12抑制FXIIa

[0401] 在蛋白质印迹上,5C12 MAb通过与蛋白酶结构域结合来识别人和狒狒以及非洲绿猴FXII的 $\alpha$ 和 $\beta$ 形式,但不识别其它测试物种的FXII(图3A-3C),并延长了与耗尽FXII的血浆混合的人和狒狒血浆的aPTT(图2A-2B),但未延长其它测试物种(图2C-2F)。增加5C12的浓度会延长人和狒狒血浆中的凝结时间(图1A-1B),在约50至60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (330-400nM)达到耗尽FXII的血浆的aPTT,并建议通过与抗体1:1的复合物抑制FXII。与明确表征的FXIIa抑制剂CTI(Hansson et al.,J Thromb Haemost 2014;12:1678-1686)相比,5C12更有效,在200nM具有可测量的aPTT延长(图1C)。当FXII暴露于接触活化剂时,5C12阻止了酰胺分解活性的产生(图4A-4C)并且阻断了等摩尔量的FXIIa的酰胺分解活性,这与活性位点抑制一致(图4D)。在硫酸葡聚糖存在下,5C12不抑制激肽释放酶对FXII的活化(图4E)。这些数据表明5C12通过与FXII的催化结构域结合而抑制FXIIa。

[0402] 5C12是有效的体内抗凝剂

[0403] 在剂量递增的最初几个小时内,施用5C12使aPTT增加4倍,使ACT增加3倍(图5A-5B),而不会影响凝血酶原时间或循环TAT水平(图5C-5D)。全血细胞计数参数,包括血小板计数、血细胞比容以及白细胞和红细胞计数保持在正常参考范围内(图5E-5H)(Hainsey et al.,Lab Anim Sci 1993;43:236-243)。

[0404] 5C12抑制体外膜肺氧合器中的血小板沉积

[0405] 在狒狒中,肝素使aPTT比基线升高1.6倍(1.5至1.7),使ACT比基线升高1.3倍(1.2至1.5)(表1)。施用5mg/kg的5C12使aPTT升高2.6倍(2.3至3.3),使ACT升高1.8倍(1.7至1.9),而不会升高止血缺陷标记物PT。肝素和5C12的组合使aPTT升高3.9倍(3.4至4.5),使ACT升高2.3倍(2.1至2.3),而不会升高止血缺陷标记物PT。在aPTT测定中5C12的抗凝作用可测量3天(图5A-5B)。

[0406] 表1:在抗凝和体外膜肺氧合器灌注过程中凝结参数的变化。在暴露于抗凝剂之前以及在每个实验的开始(0分钟)和结束(60分钟)时,测定三个狒狒中的APTT、ACT和PT值。

	APTT (秒)		ACT (秒)		PT (秒)	
基线(n=6)	30.7±0.5		208.5±11.4		8.3±0.2	
	开始(0分钟)	结束(60分钟)	开始(0分钟)	结束(60分钟)	开始(0分钟)	结束(60分钟)
[0407] 溶媒 (n=2)	30.2±0.5	33.4±0.2	200.5±12.6	176.8±11.4	8.2±0.2	8.3±0.4
肝素(20 U/kg) (n=4)	49.1±2.4	34.2±0.8	271.5±11.2	190.6±5.9	8.6±0.2	8.7±0.2
5C12 (5 mg/kg) (n=3)	79.5±6.9	82.9±4.8	381.5±8.3	394.8±9.9	8.4±0.1	8.6±0.1
5C12 (5 mg/kg)+ 肝素(20 U/kg) (n=3)	121.0±9.7	77.5±2.7	472.6±25.6	378.7±11.9	9.0±0.1	8.8±0.2

[0408] 在非抗凝血的狒狒中,氧合器中的血小板沉积是在5分钟检测到的(图6A),并且从灌注开始起的30分钟到60分钟之间,血小板保留率平均为每分钟 $1.64 \pm 0.13$ 十亿(bpm)(图6B)。在肝素化的狒狒中,在25分钟可测量血小板沉积,并在30至60分钟之间以 $1.21 \pm 0.08$ bpm的速率生长(图6B)。用5C12预处理将血小板保留率降低至 $0.61 \pm 0.05$ bpm(无肝素)和 $0.56 \pm 0.04$ bpm(有肝素)(图6B)。通过向肝素中补充5C12,将终点血小板沉积从 $52 \pm 11$ 降低至 $24 \pm 4$ 十亿血小板,将氧合器的终点纤维蛋白含量从 $45 \pm 15$ mg降低至 $15 \pm 4$ mg(图6C-6D)。纤维蛋白和血小板含量显示出显著的相关性( $R^2=0.99$ ),表明血小板活化在氧合器血栓形成中起关键作用(图6E)。对于所有治疗方案,狒狒的止血参数(出血时间、出血量和出血速率)保持在正常范围内(图9A-9C)。

[0409] 在非抗凝血的狒狒中,氧合器灌注后血浆TAT水平从 $12$ ng/ml(8-20ng/mL范围)的基线增加60倍至 $726$ ng/ml(521-938ng/mL范围)(图8A)。在肝素化的狒狒中,TAT增加了37倍,当5C12与肝素组合时,TAT增加了14倍。氧合器灌注60分钟后,血浆PF4水平在未经处理的狒狒中增加了11倍,在肝素化的狒狒中增加了7倍,并且在5C12+肝素组合处理的狒狒中增加了3倍(图8B)。

[0410] 治疗应用

[0411] 本文公开的研究首次证明,即使5C12是靶向接触系统的抗凝剂,抗凝血抗FXII MAbs 5C12的静脉内施用也显著降低了非人灵长类动物中的体外膜肺氧合器中的血小板积聚。5C12结合至FXII催化结构域,在该位置上,当激肽释放酶将FXII酶原转化为FXIIa时,它阻断蛋白酶活性位点。5C12 MAbs主要是(如果不是排他性的话)通过限制凝血酶产生来抑制接触活化引发的凝血试验(例如aPTT和ACT)中的凝结。虽然预期对FXII活性的抑制不会对最初血小板粘附在膜上以及随后积聚在膜上产生深远影响,但数据表明,氧合器中的血小板活化受到FXIIa活性的强力支持,并且除了纤维蛋白积聚外,还可能导致闭塞装置故障,尽管在膜肺氧合器筒中计算出的初始平均壁剪切率较低。

[0412] 对于狒狒实验,在膜肺氧合器中使用了低剂量的肝素,该低剂量的肝素在aPTT测定中产生了可测量的抗凝血作用,但并未完全阻止可量化的血小板积聚。该剂量防止了筒的堵塞,同时仍然可以证明5C12的抗血栓形成作用。小儿ECMO期间使用高剂量的肝素,这会导致出血并发症(ELSO Anticoagulation Guideline.2015)。在肝素存在下5C12具有明显的抗血栓形成的发现表明,与5C12组合使用时,肝素可以以较低剂量施用,这可能为ECOS期

间提供了潜在的更安全的抗凝方法,所述ECOS涉及通过例如ECMO的装置的血液灌注,因为FXII在止血方面没有已知作用。

[0413] FXII的生理功能尚未建立。FXII酶原蛋白存在于大多数陆生脊椎动物中,但是在鸟类和水生鲸类中却不存在(Poncdek et al., *J Thromb Haemost* 2008;6:1876-1883)。在陆生脊椎动物中,哺乳动物独自合成FXI,FXI充当FXII和下游凝血酶生成之间的桥梁。但是,FXIIa可以在体外缩短FXI缺陷型血浆的接触起始凝血时间(Puy et al., *J Thromb Haemost* 2013;11:1341-1352),这可能是由于FXIIa可以裂解几种大分子底物,包括某些凝血抑制剂,例如抗凝血酶。FXII的非生理或致病作用已被许多研究人员证明,主要是在实验条件下,在临床上也有少数。例如,FXII促进实验性胚胎植入(Matsubayashi et al., *Am J Reprod Immunol* 2008;59:316-322;Kawato et al., *Reprod Fertil Dev* 2009;21:840-847)、促进组织修复、血管生成和有丝分裂(LaRusch et al., *Blood* 2010;115:5111-5120),通过激肽释放酶活化和缓激肽产生来增强血管舒张和炎症(Björkqvist et al., *Thromb Haemost* 2013;110:399-407),可能通过树突状细胞相互作用促进自身免疫性疾病发病机理(Gobel et al., *Nat Commun* 2016;7:11626),可能有助于实验性血栓形成过程(美国专利号9,574,013;Larsson et al., *Sci Transl Med* 6:222ra17,2014;Worm et al., *Ann Transl Med* 3:247,2015),并且中性粒细胞产生的FXII似乎在正常的嗜中性粒细胞功能中起作用(Stavrou et al., *J Clin Invest* 2018;128:944-959)。尽管有所有这些数据,但病理学并未与FXII缺乏相关,尽管缺乏天然FXIIa抑制剂(例如C1Inh)可以产生局部和全身性反应,这与减少对接触活化的抑制和缓激肽生成过多(例如在血管性水肿中看到的)一致。本文公开的数据支持这样的前提,即在血栓形成和出血都是直接风险的医疗程序中,也可以使用FXII抑制。这可能包括ECOS系统,包括血液透析、ECMO、左心室辅助装置或心肺转流(Cheng et al., *Ann Thorac Surg* 2014;97:610-616)。

[0414] 根据流行病学观察,表明低-正常的FXII水平与心血管疾病之间存在关联,一些研究人员从这些数据推断出,FXII活性的严重降低(例如FXII缺乏)可能与血栓形成的风险增加相关(Goodnough et al., *Med* 1983;62:248-255;Kuhli et al., *Am J Ophthalmol* 2004;137:459-464)。但是,尚未确定FXII缺乏中心血管疾病的发病率、预后或患病率,并且对普通人群的其它观察性研究未发现FXII水平与血栓形成的易感性之间存在关联(Girolami et al., *J Thromb Thrombolysis* 2004;17:139-143;Zeerleder et al., *Thromb Haemost* 1999;82:1240-1246)。FXI(FXIIa的底物)的缺乏可能会导致轻度至中度出血素因,但也会降低血栓形成的风险(Salomon et al., *Thromb Haemost* 2011;105:269-273;Preis et al., *Blood* 2017;129:1210-1215;Salomon et al., *Blood* 2008;111:4113-4117)。FXI抑制剂正在临床开发中(Tillman et al., *Blood Rev* 2018;32:433-448;Gailani et al., *J Thromb Haemost* 2015;13:1383-1395),FXI反义寡核苷酸在膝关节置换术后的静脉血栓栓塞预防的2期试验中证明了改良的结果(Buller et al., *N Engl J Med* 2015;372:232-240)。用反义寡核苷酸抑制FXI或FXII在导管诱发的血栓形成的兔模型中显示了相似的抗血栓形成功效和安全性(Yau et al., *Blood* 2014;123:2102-2107)。FXII抑制剂的开发处于早期阶段。已经描述了一些单克隆抗FXII/FXIIa抗体,但尚未进行人体试验。几十年前,在败血症的狒狒模型中发现单克隆抗FXII抗体C6B7减弱了低血压,但并未消除弥散性血管内凝血(DIC)的迹象;但是,该抗体仅在狒狒血浆中抑制FXII活性约

60% (Pixley et al., *J Clin Invest* 1993;91:61-68)。最近,抗FXIIa单克隆抗体3F7减少了兔ECMO模型中的血栓形成,并被评估为遗传性血管性水肿的潜在治疗方法 (Larsson et al., *Sci Transl Med* 2014;6:222ra17; Worm et al., *Ann Transl Med* 2015;3:247; Farkas et al., *Expert Opin Investig Drugs* 2018;27:87-103)。靶向FXII的其它方法包括基于CTI的合成肽 (Baeriswyl et al., *ACS Chem Biol* 2015;10:1861-1870)、抗FXII纳米抗体 (de Maat et al., *Thromb Haemost* 2013;110:458-468) 和抗核酸酶的FXII抑制性RNA适体 (Woodruff et al., *J Thromb Haemost* 2013;11:1364-1373)。FXII反义寡核苷酸也已经在动物研究中进行了测试 (Yau et al., *Blood* 2014;123:2102-2107)。由于反义寡核苷酸需要数周才能达到功效并产生持续的FXII缺乏 (Buller et al., *N Engl J Med* 2015;372:232-240), 因此它们可能对长期的血栓预防有用。

[0415] 这项研究的结果表明5C12 MAb在体内与循环FXII形成抑制复合物,可有效减少体外膜肺氧合器设备中血小板依赖性血栓的形成,而模板出血时间 (template bleeding time) 却无明显变化。重要的是,已证明5C12与肝素的组合改善了单独使用肝素的抗凝作用的抗血栓形成功效。

[0416] 实施例3:在致命金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 暴露的狒狒模型中使用5C12 (AB053) 评估FXIIa抑制

[0417] 本实施例描述了评估致命全身性炎症反应综合征 (SIRS) 的狒狒模型中预防性5C12 (以下称为“AB053”) 的作用的研究。有时在接受杀菌抗生素以预防或治疗败血症的患者中观察到有或没有血管内凝血和/或凝血病的SIRS。在连续2个小时的静脉输注300亿热灭活的金黄色葡萄球菌之前,立即对狒狒进行“饱和”剂量的AB053 (10mg/kg) 或无抗体的静脉注射。在8小时 (10mg/kg) 和24小时 (5mg/kg) 之后施用两次另外的AB053剂量。监测生命体征并采集血样以测量器官功能以及凝血、炎症和器官损伤的标志物。未经治疗的动物 (n=3) 出现严重的SIRS和休克,几乎所有监测的标志物在6至24小时内均发生明显变化,并且动物必须在48小时内安乐死。相比之下,接受AB053 (n=3) 的狒狒存活下来,没有SIRS的发展、严重疾病和血液标志物的重大变化。7天后对幸存者实施安乐死以进行最终分析。这项研究的结果表明,用AB053几乎完全抑制FXIIa可以阻止了狒狒中金黄色葡萄球菌暴露诱导的致命SIRS的发展。

[0418] 生化检验

[0419] 使用Contour Next血糖仪 (Bayer HealthCare LLC, Mishawaka, IN) 测量血糖。通过Lactate Scout (EKF Diagnostics GmbH, Barleben, Germany) 测量血乳酸。使用标准临床测试测量血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、淀粉酶、肌酐、血尿素氮、钾、磷酸盐和乳酸脱氢酶水平。通过使用FluoroMPO髓过氧化物酶检测试剂盒 (Cell Technology, Fremont, CA) 对血浆中的髓过氧化物酶 (MPO) 活性进行定量。

[0420] CBC

[0421] 使用收集到K<sub>2</sub>-EDTA涂覆的小瓶中的血液测量全血细胞计数 (CBC), 并使用Abaxis Vetscan HM5 (Abaxis, Union City, CA) 进行分析。

[0422] aPTT

[0423] 在用0.32% 柠檬酸钠 (终浓度) 抗凝的血浆样品中测定活化部分凝血活酶时间 (aPTT)。将50μL血浆与50μL aPTT试剂 (Pacific Hemostasis Kontakt, Cat#100312TS,

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 在37℃孵育3分钟。孵育后,加入50μL 25mM CaCl<sub>2</sub> (Pacific Hemostasis CaCl<sub>2</sub>, Cat#100314TS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 并在KC4A分析仪 (Amelung GmbH, Lemgo, Germany) 上测定凝结时间。

[0424] PT

[0425] 在用0.32%柠檬酸钠抗凝的血浆样品中测定凝血酶原时间 (PT)。将50μL血浆在37℃下孵育1分钟。孵育后,加入100μL Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS (Cat# 100354TS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 并在KC4A分析仪上测定凝结时间。

[0426] 抗凝血酶ELISA测定

[0427] 通过定制的酶联免疫吸附测定法测量了活化因子与抗凝血酶的复合物 (FXIIa-AT, Kallikrein-AT, FXIa-AT, FVIIa-AT, TAT)。用以下亲和纯化抗体中的一种 (100μL/孔) 在4℃下将板包被过夜: (i) 山羊抗人FXII (2μg/mL); (ii) 绵羊抗人FXI (2μg/mL); (iii) 绵羊抗人凝血酶 (2μg/mL), 均来自Affinity Biologicals; 或 (iv) 山羊抗人FVII (0.3μg/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 或 (v) (绵羊抗人前激肽释放酶抗体, Affinity Biologicals)。每个步骤后,将板用含有0.1% Tween-20的PBS洗涤,然后用含有1% BSA的相同缓冲液封闭。将EDTA血浆样品在含有1% BSA、5mM EDTA、5mM苯甲脒盐酸盐、0.1% Tween-20的PBS中孵育60分钟。生物素化的亲和纯化绵羊抗人抗凝血酶 (0.5μg/mL, Affinity Biologicals) 用于检测,然后使用链霉亲和素-HRP (400ng/mL, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) 和邻苯二胺 (OPD) 作为底物。在492nm处记录吸光度值。

[0428] 其它ELISA测定

[0429] 使用DuoSet ELISA试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 对血浆激肽原 (所有形式)、纤溶酶原激活剂抑制剂1 (PAI-1) 和组织型纤溶酶原激活剂 (tPA) 进行定量。对于纤溶酶-抗纤溶酶复合物,使用亲和纯化的山羊抗人纤溶酶原 (2μg/mL, Affinity Biologicals) 作为捕获物,辣根过氧化物酶偶联的山羊抗人α<sub>2</sub>-抗纤溶酶 (1μg/mL, Affinity Biologicals) 作为检测抗体。使用小鼠单克隆抗人D-二聚体 (克隆DD1, 1μg/mL, Novus Biologicals, Littleton, CO) 作为捕获物,辣根过氧化物酶偶联的绵羊抗人纤维蛋白原 (2μg/mL, Affinity Biologicals) 作为检测抗体进行D-二聚体ELISA。使用MILLIPLEX MAP非人灵长类动物细胞因子磁珠组 (EMD Millipore, Billerica, MA) 对血浆细胞因子进行定量。使用小鼠单克隆抗人C3b/c IgG, 克隆C3-28 (Cell Sciences) 用于捕获,山羊抗人C3 (Complement Technologies) 作为检测抗体来测量C3b。使用单克隆抗体aE11 (Enzo Life Sciences) 作为捕获抗体来测量C5b-9,并且抗人C6生物素化的抗体 (Quidel Corporation, San Diego, CA) 用作检测抗体。使用细胞死亡检测ELISA PLUS试剂盒 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 对核小体进行定量。

[0430] 细菌

[0431] 金黄色葡萄球菌亚种 *aureus* Rosenbach (ATCC 12598) 购自美国模式培养物保藏所 (ATCC, Manassas, VA)。为了控制细菌的标准剂量并避免活生物体可能造成的混杂影响,将指数相培养的金黄色葡萄球菌用生理盐水溶液充分洗涤并计数,然后在70℃下加热1小时。等分试样在-80℃下储存直至使用。为了一致性,动物用来自单一制剂的细菌挑战 (challenge)。

[0432] 动物

[0433] 总共6只动物用于这些终末研究。使用了六个体重在6.7至20.2kg之间的健康的幼年狒狒(*Papio anubis*和*ursinus*)。作为研究的一部分,使用抑制FXI的接触活化的FXI抗体AB023公布了对照组动物的数据(Silasi et al., Blood Advances 3(4):658-669 2019)。

#### [0434] 实验

[0435] 实验设计包括2个臂:对照组(n=3)和处理组(n=3)。两组动物均用300亿热灭活的金黄色葡萄球菌(狒狒中已确定的致死剂量)挑战,在2小时内进行静脉输注。未处理的对照组仅接受细菌输注,而处理组在开始细菌输注之前30分钟接受弹丸式的AB053(10mg/kg)(预处理),并在金黄色葡萄球菌输注开始后8小时(10mg/kg)和24小时(5mg/kg)接受两次另外的静脉弹丸注射。细菌输注开始的时间点被指定为T0。细菌输注开始后八小时(T+8),将动物放回恢复笼并观察,直到它们表现出无法恢复的器官衰竭和败血性休克的迹象,然后将其人道地安乐死。在第7天对存活的动物实施安乐死。

#### [0436] 重症监护

[0437] 用Caidell Max-12 HD Duo监护仪监测呼吸和心率、温度和全身平均动脉血压(MSAP)。在每次血样采集之前记录这些生理数据,前8小时每15分钟记录一次,直到动物返回恢复笼为止,然后每天一次持续3天,然后在第7天记录。

#### [0438] 血样收集

[0439] 使用以下抗凝剂和血容量在T-0.5、0、+2、+4、+6、+8、+24、+48、+72和+168小时收集全身血样:3ml血液放入K<sub>2</sub>-EDTA涂覆的小瓶中,2ml血液放入含有0.32%柠檬酸钠的小瓶中,以及1ml血液用于血清。在最初的24小时周期内抽出的血液总量不到动物计算出的血容量(70mL/kg)的10%。

#### [0440] 数据和统计分析

[0441] Prism(GraphPad Software 7.0d)用于统计分析。数据以平均值±平均值的标准误差给出。在每个时间点使用2-tailed Student's t-检验对两组进行比较。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001时,结果被认为是显著的。对数秩Mantel-Cox检验用于存活曲线的比较。

[0442] 这项研究的主要终点是存活。在未处理(阴性对照组)组中,需要在24小时内对3只动物中的2只进行安乐死,在第二天对第三只动物进行安乐死,而三只经AB053处理的动物存活到7天。AB053预处理将aPTT提高到大于100秒,但没有增强对照动物中观察到的金黄色葡萄球菌暴露导致的aPTT升高。此外,AB053处理减弱了金黄色葡萄球菌诱导的PT的增加。凝血活化被评估为抗凝血酶与多种凝血酶的复合物水平的变化。抗凝血酶-酶复合物在金黄色葡萄球菌暴露数小时内增加,并且AB053处理减弱了这些反应。AB053处理还减弱了纤维蛋白原消耗和纤维蛋白(原)裂解的活化。补体活化和细胞死亡的标志物(在金黄色葡萄球菌暴露后均升高)的分析在AB053臂中均降低。AB053显著降低了金黄色葡萄球菌暴露后数小时内观察到的几种炎症细胞因子的活化(细胞因子风暴)。在暴露后的最初8小时内,所有动物的生命体征均受到密切监测,表明AB053治疗抵消了金黄色葡萄球菌暴露引起的低血压。AB053还减少了肝脏、肾脏和胰腺损伤,或帮助维持了它们的功能。与未处理的动物相比,AB053阻止了白细胞和血小板计数减少,并减少了血小板活化的全身标志物。AB053还防止血浓缩。

#### [0443] 结论

[0444] 这项研究的结果表明,AB053对狒狒中的金黄色葡萄球菌暴露诱导的致命SIRS提

供有效的保护。与未处理的对照相比,所有经AB053处理的动物均幸存于金黄色葡萄球菌的致死剂量。结果表明,FXII在金黄色葡萄球菌暴露诱导的致命SIRS的发展中起重要的致病作用。

[0445] 实施例4:5C12(AB053)的人源化

[0446] 该实施例描述了基于鼠抗体5C12(在本文中也称为“AB053”)的序列的人源化抗体文库的产生。

[0447] 抗体

[0448] 如实施例1中所述产生AB053。AB053的人源化是通过LakePharma (Belmont, CA) 的CDR移植(CDR-grafting)技术进行的。

[0449] 表达载体的构建

[0450] 通过首先合成人源化实验中设计的可变区序列来构建全长抗体基因。优化序列以在哺乳动物细胞中表达。然后将这些可变区序列克隆到已经包含人IgG4(S241P铰链修饰的)Fc结构域的表达载体中。

[0451] 为了比较,使用与上述相同的骨架人Fc序列将鼠AB053重链和轻链的可变区构建为全长嵌合链。

[0452] 小规模生产

[0453] 通过三种人源化重链和三种人源化轻链的组合产生的九种人源化抗体进行0.01L生产。嵌合亲本抗体也按比例放大用于直接比较。将所示重链和轻链的质粒转染到悬浮HEK293细胞中,使用无血清的化学成分确定的培养基用于抗体生产。然后使用MabSelect SuRe蛋白A树脂(GE Healthcare)从条件培养基中纯化全长抗体。

[0454] 结果

[0455] 基于两种不同的人类重链受体骨架设计了三种人源化重链,并且基于两种不同的人类轻链受体骨架设计了三种人源化轻链(表2)。

[0456] 表2:人源化链信息

链名称	链类型	受体骨架
H7879 (嵌合亲本)	重链	N/A
L7879 (嵌合亲本)	轻链	N/A
H7880 (人源化 HC1)	重链	HC 骨架 1
[0457] H7881 (人源化 HC2)	重链	HC 骨架 1
H7882 (人源化 HC3)	重链	HC 骨架 2
L7880 (人源化 LC1)	轻链	LC 骨架 1
L7881 (人源化 LC2)	轻链	LC 骨架 1
L7882 (人源化 LC3)	轻链	LC 骨架 2

[0458] 第一种人源化重链/轻链利用各自的第一骨架,并包含具有最少亲本抗体骨架序列的最多人序列(人源化HC1和LC1;分别为SEQ ID NO:7和9)。第二种人源化重链/轻链使用与人源化HC1/LC1相同的骨架,但包含另外的亲本序列(人源化HC2和LC2;分别为SEQ ID NO:13和17)。第三种人源化重链/轻链利用第二相应的骨架,并且类似于人源化HC2/LC2,还包含与人源化骨架融合的另外的亲本序列(人源化HC3和LC3;分别为SEQ ID NO:15和19)。

[0459] 然后将人源化重链和轻链组合以产生九种不同的完全人源化抗体,以及包含鼠单克隆抗体AB053的可变区和S241P铰链修饰的IgG4的人Fc区的嵌合抗体(表3)。这些抗体在HEK293中瞬时表达,并以小规模生产的形式生产,用于测试和选择先导(lead)人源化抗体候选物(参见实施例5)。

[0460] 表3:HEK293细胞中瞬时表达的抗体

	抗体名称	抗体 ID	滴度(mg/L)
	嵌合体	PP13892	80
	HC1 + LC1	PP13893	128
	HC1 + LC2	PP13894	59
	HC1 + LC3	PP13895	114
[0461]	HC2 + LC1	PP13896	26
	HC2 + LC2	PP13897	63
	HC2 + LC3	PP13898	72
	HC3 + LC1	PP13899	88
	HC3 + LC2	PP13900	71
	HC3 + LC3	PP13901	153

[0462] 实施例5:先导人源化候选物的选择

[0463] 该实施例描述了从实施例4中所述的九种抗体中鉴定先导人源化抗体。通过人化得分(humanness score)、结合特征(ELISA、Octet)、aPTT和FXIIa活性的抑制来评估抗体。

[0464] 人性得分(Humanness Score)

[0465] LakePharma开发了计算单克隆抗体的人性得分(T20得分)的工具(Gao et al., BMC Biotechnology 13:55,2013)。简而言之,T20得分通过分析可变区的一级序列来表示抗体人性程度。对于全长重链,得分为79或更高表示它看起来似人类;对于全长κ轻链,得分为86或更高表示它看起来似人类。由于全长可变区的T20得分会受到人源化过程中保持不变的CDR区的低人性的显著影响,因此还计算了人源化抗体的骨架的T20得分。对于重链骨架,得分为84或更高表示它看起来似人类;对于κ轻链骨架,得分为90或更高表示它看起来似人类。

[0466] ELISA

[0467] 用 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人FXII (Enzyme Research Labs, #HFXII 1212) 在 $4^{\circ}\text{C}$ 下包被ELISA板过夜。在室温下用2%BSA的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS) 封闭包被板1小时, 然后用PBS洗涤3次。将所有待测抗体(PP13892-PP13901或人Fc同种型对照) 用样品稀释液稀释, 从 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始以5倍连续稀释11个点。每个样品一式两份进行。将每种浓度在包被板上在室温下孵育1小时, 然后用PBS洗涤3次。用山羊抗人IgG-HRP检测结合的抗体, 并用PBS洗涤六次。将TMB底物添加到每个孔中, 并用 $1\text{M HCl}$ 终止反应。在 $450\text{nm}$ 处读取吸光度。

[0468] 通过将 $450\text{nm}$ 处测得的OD相对于抗体浓度的对数作图来计算浓度响应曲线的 $\text{EC}_{50}$ , 并通过非线性回归分析来计算 $\text{EC}_{50}$ 。

[0469] Octet

[0470] 在Octet RED96系统(ForteBio) 上进行了多浓度动力学实验。将抗人Fc生物传感器(ForteBio) 在样品稀释液(0.1%BSA的PBS和0.02%Tween 20) 中水合, 并在 $\text{pH } 1.9$ 甘氨酸中进行预处理。用样品稀释液稀释抗原, 从 $200\text{nM}$ 开始以3倍系列稀释7个点。用样品稀释液将抗体稀释至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ , 然后固定化在抗人Fc生物传感器上。在样品稀释液中建立基线30秒后, 将生物传感器移至含有连续稀释的抗原的孔中, 以测量结合和解离。观察结合180秒, 观察解离300秒。通过将动力学传感图拟合到单价结合模型(1:1结合) 来表征结合亲和力。

[0471] aPTT

[0472] 将用0.38%柠檬酸钠抗凝的合并的人血浆( $90\mu\text{L}$ ) (来自三个个体受试者) 与 $10\mu\text{L}$ 不同浓度(0-75或 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的抗体或对照(PBS) 混合, 并在室温下孵育5分钟。然后将 $40\mu\text{L}$ 血浆/抗体混合物与 $40\mu\text{L}$  aPTT试剂(SynthASil, #0020006800, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) 在 $37^{\circ}\text{C}$ 下孵育3分钟。孵育3分钟后, 加入 $40\mu\text{L CaCl}_2$ , 并在KC4分析仪(TCoag) 上确定凝结时间。每个样品一式两份测定。

[0473] FXIIa抑制

[0474] 制备HEPES缓冲生理盐水中 $20\text{nM}$  FXIIa (Enzyme Research Labs#HFXIIa3350) (HBS) +0.1%BSA的溶液。将每种人源化抗体以及鼠单克隆AB053和嵌合抗体添加到 $20\text{nM}$  FXIIa溶液中, 最终抗体浓度为 $10\text{nM}$ 。将 $90\mu\text{L}$ 每个抗体样品一式两份铺在96孔板上, 并将 $10\mu\text{L}$ 显色底物S-2302加入每个孔中。在 $37^{\circ}\text{C}$ 下在 $405\text{nm}$ 处读取板15分钟。

[0475] 人源化链的人性得分的计算

[0476] 表4中示出了亲本和人源化抗体的T20得分。

[0477] 表4: 所有人源化链的人性得分

	<b>VH</b>	<b>全长 (骨架 + CDR) 临界值 = 79</b>	<b>仅骨架 临界值 = 84</b>
	亲本	73	72
	HC1	88	93
	HC2	86	89
	HC3	88	90
[0478]	<b>VL</b>	<b>全长 (骨架 + CDR) 临界值 = 79</b>	<b>仅骨架 临界值 = 84</b>
	亲本	63.1	68
	LC1	88	96
	LC2	86	93
	LC3	85	91

[0479] 通过ELISA进行亲和力测量

[0480] 图11中示出了ELISA的亲和力测量结果。表5中列出了每种抗体的计算出的EC<sub>50</sub>。

[0481] 表5: 人源化和嵌合抗体的计算出的EC<sub>50</sub>

	<b>抗体 ID</b>	<b>EC<sub>50</sub> (ng/mL)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	
	嵌合体	PP13892	9.036	0.9989
	HC1 + LC1	PP13893	9.116	0.9985
	HC1 + LC2	PP13894	8.222	0.9984
[0482]	HC1 + LC3	PP13895	9.018	0.9990
	HC2 + LC1	PP13896	8.238	0.9993
	HC2 + LC2	PP13897	8.777	0.9991
	HC2 + LC3	PP13898	8.093	0.9994
	HC3 + LC1	PP13899	8.479	0.9992
	HC3 + LC2	PP13900	7.695	0.9992
[0483]	<b>抗体 ID</b>	<b>EC<sub>50</sub> (ng/mL)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	
	HC3 + LC3	PP13901	9.467	0.9987

[0484] 通过Octet进行亲和力测量

[0485] 表6中示出了通过Octet测量的九种人源化抗体以及嵌合抗体的亲和力测量。

[0486] 表6: 人源化和嵌合抗体的动力学测量

	抗体 ID	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
	PP13892	2.4E-10	4.6E+05	1.1E-04
	PP13893	3.0E-10	5.3E+05	1.6E-04
	PP13894	3.0E-10	5.3E+05	1.6E-04
	PP13895	4.1E-10	5.0E+05	2.0E-04
[0487]	PP13896	4.4E-10	5.0E+05	2.2E-04
	PP13897	1.5E-10	6.2E+05	9.0E-05
	PP13898	3.1E-10	5.0E+05	1.6E-04
	PP13899	2.7E-10	5.6E+05	1.5E-04
	PP13900	3.2E-10	5.8E+05	1.9E-04
	PP13901	3.5E-10	5.3E+05	1.8E-04

[0488] KD=平衡解离常数

[0489] Kon=结合常数

[0490] Koff=解离常数

[0491] aPTT筛选

[0492] 图12中示出了人血浆中的aPTT浓度-响应曲线的结果。

[0493] 人源化抗体对FXIIa活性的影响

[0494] 图13中示出了固定浓度的5C12抗体变体对FXIIa活性的影响。根据上述数据,选择人源化抗体PP13893 (HC1+LC1) 作为先导候选物,作为抗体AB054用于继续开发。AB054与AB053对人和狒狒血浆中aPTT的比较

[0495] 将AB054对人和狒狒血浆中aPTT延长的作用与鼠亲本抗体AB053的作用进行比较(图14A-14B)。

[0496] 总结

[0497] 在该实施例中描述的结果表明AB053被成功地人源化,选择了PP13893 (以下称为“AB054”)用于进一步研究。抗体AB054的KD为0.3mM,并且表明延长了人和狒狒血浆中的aPTT,这与鼠单克隆AB053相似。此外,AB054抑制人FXIIa,证实人源化后维持与FXII的结合和对FXIIa活性的抑制。

[0498] 实施例6:膜肺氧合器灌注系统中AB054的抗血栓形成功效的评估

[0499] 本实施例描述了在表面引发的血栓形成模型中评估AB054的抗血栓形成作用的研究。在狒狒中表面引发的血栓形成模型中测试了抗体。在狒狒动静脉分流的延长环中插入用于体外膜肺氧合的小儿膜肺氧合器。在用AB054、肝素或两者组合处理后,测量膜肺氧合器内的凝块形成和生长。本文公开的数据表明,单独的AB054或AB054与肝素组合减少了在膜肺氧合器设备内的血栓形成。

[0500] 介绍

[0501] 血液接触型医疗设备,包括导管、支架、移植物、过滤器和体外器官支持系统,可能由于系统中的血栓积聚而失效,并且还可能触发与设备相关的血栓栓塞。为了保持通畅,在

各种时间长度灌注的设备都需要预防性抗凝,这会增加值的发生率和/或严重程度。体外膜肺氧合(ECMO)已越来越多地用于急性呼吸衰竭的短期治疗,例如在复杂的流感情况下或在急性心力衰竭的暂时缓解中;但是,与抗凝相关的出血降低了其益处。ECMO系统具有几个促进血小板和血液凝结接触系统的活化的组件,包括暴露于流动血液中的中空纤维和膜。抑制血液凝结接触活化途径已经被提出作为更安全的抗凝的替代方法。

[0502] aPTT、ACT、PT和CBC

[0503] 测定了用0.32%柠檬酸钠抗凝的血浆样品中的活化部分凝血活酶时间(aPTT)。将40 $\mu$ L血浆与40 $\mu$ L aPTT试剂(SynthASil,#0020006800,Instrumentation Laboratory, Bedford,MA)在37 $^{\circ}$ C下孵育3分钟。孵育后,加入40 $\mu$ L 20mM CaCl<sub>2</sub>,并在KC4分析仪上测定凝结时间(TCoag,Ltd,Ireland)。

[0504] 测定了非抗凝血样中的活化凝血时间(ACT)。抽血后,立即使用KC4<sup>TM</sup>分析仪(TCoag,Ltd,Ireland)将40 $\mu$ L血液加入40 $\mu$ L LupoTek KCT(r<sup>2</sup>-Diagnostics,South Bend, IN)中,并记录凝结时间。

[0505] 测定用0.32%柠檬酸钠抗凝的血浆样品中的凝血酶原时间(PT)。将40 $\mu$ L血浆在37 $^{\circ}$ C下孵育3分钟。孵育后,加入40 $\mu$ L Dade<sup>®</sup>Innovin<sup>®</sup>(Siemens Healthcare,Marburg, Germany),并在KC4分析仪上测定凝结时间。

[0506] 使用收集到K<sub>2</sub>-EDTA涂覆的小瓶中的0.25mL血液测量全血细胞计数(CBC),并使用Hemavet 950FS(Erba Diagnostics,Germany)进行分析。

[0507] AB054抗体的产生

[0508] 通过在LakePharma(Belmont,CA)的HEK293细胞中瞬时表达来产生实验级AB054。简而言之,将每种DNA表达构建体按比例放大至适合转染的量。质粒DNA在琼脂糖凝胶上电泳以进行质量评估,并在进行转染前确认序列。将悬浮HEK293细胞接种到摇瓶中,并使用无血清的化学成分确定的培养基进行扩增。转染当天,将扩增的细胞接种到装有新鲜培养基的新烧瓶中。使用LakePharma标准操作程序将每种DNA构建体瞬时转染到HEK293细胞中。细胞作为分批进料培养(C4541和C4542,Medna)保持,直到生产运行结束。

[0509] 通过离心和过滤,从瞬时生产运行中收获和澄清条件培养基。将上清液加到用结合缓冲液预平衡的蛋白质A柱上。洗涤缓冲液通过该柱,直到OD280值(NanoDrop,Thermo Scientific)测得为零。用低pH缓冲液洗脱靶蛋白,收集组分,并记录每个组分的OD280值。合并含有靶蛋白的组分,并通过0.2 $\mu$ m膜过滤器过滤。根据OD280值和计算出的消光系数(1.60mg/mL<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)计算蛋白质浓度。

[0510] 动物

[0511] 共对两只狒狒进行了9次氧合器灌注实验,包括3个处理组(表7)。实验在每只狒狒上进行了两周的周期。

[0512] 处理组

[0513] -第1组:在开始膜肺氧合器灌注前15分钟施用肝素(20U/kg)(n=3)

[0514] -第2组:在开始膜肺氧合器灌注前30分钟施用AB054(5mg/kg)(n=3)

[0515] -第3组:在开始膜肺氧合器灌注前30分钟施用AB054(2mg/kg),前15分钟施用肝素(20U/kg)(n=3)。在该组中,在24小时前给予AB054(5mg/kg)的基础上加入2mg/kg AB054,以保持对FXII的完全抑制。

[0516] 表7:对每只狒狒处理的总结

	实验	狒狒 1	狒狒 2	
[0517]	第 1 周	1	20 U/kg 肝素	20 U/kg 肝素
		2	20 U/kg 肝素	5 mg/kg AB054
		3		+ 2 mg/kg AB054 + 20 U/kg 肝素
	第 2 周	4	5 mg/kg AB054	5 mg/kg AB054
		5	+ 2 mg/kg AB054 + 20 U/kg 肝素	+ 2 mg/kg AB054 + 20 U/kg 肝素

[0518] 膜肺氧合器灌注

[0519] 在体重9至15kg的幼年雄性狒狒 (*papio anubis*) 中进行了非末端膜肺氧合器灌注实验。每只狒狒有愈合的经手术安置的长期的外置动静脉 (AV) 分流, 连接股动脉和静脉。在灌注实验期间 (60分钟), 将长期AV分流扩展为合并经生理盐水处理的氧合器筒 (Terumo-CAPIOX®RX05, coated hollow fiber design, Terumo Cardiovascular Group, Ann Arbor, MI)。将灌注设定为100mL/min的受控流速。

[0520] 实验是对被限制在坐姿的轻度镇静或清醒的动物上进行的。动物在从笼子运到实验室之前, 用急性氯胺酮镇静 (10mg/kg) 或Telazol (5mg/kg) 进行镇静。为了运回笼子, 用氯胺酮 (根据需要1至2mg/kg) 或Telazol (1mg/kg) 对动物进行轻度镇静。

[0521] 在实验期间, 通过并入AV分流中的硅橡胶延长管来施用试验物, 并从硅橡胶延长管中采集血样。每天测量每只动物的全血细胞计数, 包括红细胞计数和血细胞比容, 包括实验前后, 并且在任何实验日计算出的失血量均不超过总血容量的4%。每只动物在两周的时间里分别在不同的天进行了多次实验 (每只动物4到5次)。在重复实验中, 仅使用具有充分无限制基线流量 (>250mL/min) 的分流的动物。

[0522] 血样收集

[0523] 在每次实验的开始 (0分钟) 和结束 (60分钟), 在膜肺氧合器近端收集全身血样 (1mL), 从AV分流器的中流进入1/10体积的3.2% 柠檬酸盐抗凝剂。在施用肝素的日子, 在肝素施用之前 (肝素前) 采集另外的样品。为了测量ACT, 收集0.2mL全血并立即进行分析。为了测量CBC, 将0.25mL全血收集到涂覆有K<sub>2</sub>-EDTA的试管中, 并在Hemavet 950FS上进行分析。

[0524] 止血评估

[0525] 使用标准模板皮肤出血时间测试 (Surgicutt®, International Technidyne Corp, Piscataway, NJ) 来评估试验物对狒狒的初期止血的效果。膜肺氧合器实验开始后15分钟, 由同一位专业技术人员进行所有出血时间测试。

[0526] 血小板和纤维蛋白原的放射性标记

[0527] 为了量化血小板沉积, 用1mCi的<sup>111</sup>In标记自体狒狒血小板, 然后将这些血小板重新注入动物体内, 并且在进行实验前使其循环至少1小时, 最多4天。使用与Xeleris 3.1软

件(GE Healthcare,Chicago,IL)对接的GE-Brivo NM 615,每隔5分钟测定氧合器膜上与血小板相关的放射性的积累。

[0528] 在每次研究前10分钟,静脉注射同源的<sup>125</sup>I标记的狒狒纤维蛋白原(5-25 $\mu$ g,4 $\mu$ Ci,>90%可凝性)。在实验后至少30天以使附着在血小板上的<sup>111</sup>In衰减后,使用 $\gamma$ 计数器(Wizard-3,PerkinElmer,Shelton,CT)评估标记的纤维蛋白原/纤维蛋白进入血栓中。测量沉积在设备中的<sup>125</sup>I放射性并与实验期间采集的血浆样品中可凝的纤维蛋白(原)的放射性进行比较。

[0529] 膜肺氧合器中的血小板沉积

[0530] 在灌注实验期间实时测量氧合器中的血小板沉积。用 $\gamma$ 相机每隔5分钟收集辐射数据,并分析测量的CPM原始数据以计算血小板沉积。

[0531] 纤维蛋白(原)含量

[0532] 在实验结束时,储存带有血栓的氧合器设备直到<sup>111</sup>In放射性衰减(30天以上)。这时,移植物中剩余的唯一放射性是来自标记的纤维蛋白原的<sup>125</sup>I。

[0533] 结果

[0534] 为了评估AB054的抗血栓形成功效,使用插入狒狒的动静脉分流中的体外膜肺氧合器来模拟表面引发的血栓形成。

[0535] 在实验过程中的三个时间点使用aPTT、ACT和PT测量实验过程中的抗凝作用(图15A-15C)。在实验开始(0分钟)和结束时(60分钟)采集血浆样品。如果给予肝素,则在肝素施用之前也要收集血浆。

[0536] 在每次实验中,在开始灌注后15分钟进行皮肤模板出血时间以评估止血(图16A-16C)。不同处理的出血时间、体积和速率似乎没有变化。

[0537] 为了测量膜肺氧合器中的血小板积聚,使来自分流的股动脉的血液流经设备60分钟,并返回动物的股静脉。计算保留在设备中的血小板数目和血栓的生长速率(图17A-17B)。与单独的肝素或AB054处理相比,AB054与肝素的组合似乎减少了氧合器内的血小板沉积。

[0538] 评估所有组中的终末血小板沉积和纤维蛋白(图18A-18B)。与单独的肝素或AB054治疗相比,AB054与肝素的组合减少了实验结束时测得的血小板和纤维蛋白积聚。

[0539] 结论

[0540] 这项研究的结果表明,AB054减少了体外氧合器设备中血小板依赖性血栓的形成,而凝血酶原或模板出血时间却没有明显变化。与单独的肝素相比,AB054与肝素的组合改良了抗血栓形成功效。

[0541] 实施例7:狒狒血管移植物血栓形成模型中AB054的抗血栓形成功效的评估

[0542] 本实施例描述了评估狒狒血栓形成模型中AB054的抗血栓形成作用的研究。合成的血管移植设备涂覆有胶原蛋白或组织因子以产生血栓形成表面。本文公开的数据证明,与对照相比,AB054限制了胶原蛋白引发的血栓积聚,而当血栓由组织因子引发时则没有抗血栓形成活性。这些数据与AB054作为接触途径抑制剂的作用机理一致。

[0543] 介绍

[0544] 血液接触的医疗设备,包括导管、支架和移植物,可能因血栓积聚而失效,并且还可能触发与设备相关的热栓栓塞。为了保持通畅,在各种时间长度灌注的设备都需要预防

性抗凝,这会增加出血的发生率和/或严重程度。抑制血液凝结接触活化途径已经被提出作为更安全的抗凝的替代方法。

[0545] 试剂和测量

[0546] 如实施例6中所述测量aPTT、ACT、PT和CBC。如实施例6中所述产生实验级AB054。

[0547] 动物

[0548] 共对单只狒狒进行了72次血管移植物血栓形成实验(图19)。实验进行了7周周期。

[0549] 处理组

[0550] 总共进行了72次移植物血栓形成实验。在18个研究日,进行2次灌注实验,其中1个胶原蛋白和1个组织因子涂覆的移植物插入延长的分流环,包括每天4次移植物实验-2次胶原蛋白涂覆的和2次组织因子涂覆的移植物。在第2、3和4周中,动物接受三次每周一次的9mg/kg AB054注射,并且在同一天(第1天)和随后的两天-注射后24小时(第2天)和注射后48小时(第3天)进行实验。最后一次注射后,在清除期(clear out period)的第1周和第2周进行了实验。每周包括3天的实验。在清除抗体后的第1周和第7周进行生理盐水对照。所有组N=6。

[0551] 血管移植物灌注

[0552] 在体重为10kg的幼年雄性狒狒(papio anubis)中进行了非终末移植物灌注实验。狒狒具有愈合的手术放置的长期的外置动静脉(AV)分流,连接股动脉和静脉。

[0553] 对于持续的灌注实验(60分钟),延伸长期AV分流以引入内径为4mm长度为20mm的经生理盐水处理的ePTFE(膨体聚四氟乙烯,Gore-Tex;W.L.Gore and Associates,Flagstaff,AZ)移植物,该移植物涂覆有马I型胶原蛋白(Chrono-Log Corporation,Haverton,PA)或组织因子(Dade®Innovin®,Siemens Healthcare,Marburg,Germany)。

[0554] 在非抗凝狒狒中流过分流的血流始终触发胶原蛋白涂覆的ePTFE移植物节段中的急性血栓形成。在每次实验期间,通过远端夹持将通过移植物的最大血液流速(通常约为250ml/min)限制为100ml/min,从而在4mm移植物中产生 $265\text{s}^{-1}$ 的平均初始壁剪切速率。使用超声波流量计(Transonics Systems,Ithaca,NY)连续监测流速。在血栓形成过程中,4mm移植物没有阻塞,并且脉动流速保持在100ml/min。在60分钟时从分流中取出移植物节段(和血栓),并在每次实验后恢复永久性分流。由于血栓形成通常会随着时间的推移从胶原蛋白表面向下游延伸,因此还在紧邻移植物远端的AV分流的10厘米长区域内测量血小板积聚。在该模型中,血栓生长在近端胶原蛋白或组织因子表面(“移植物”血栓)上,血栓扩散到胶原蛋白部分的远端(形成血栓“尾巴”)。

[0555] 在将动物轻度镇静并约束在坐姿时进行实验。动物在从笼子运到实验室之前,用急性氯胺酮镇静(10mg/kg)或Telazol(5mg/kg)进行镇静。为了运回笼子,用氯胺酮(根据需要1至2mg/kg)或Telazol(1mg/kg)对动物进行轻度镇静。

[0556] 在实验期间,通过并入AV分流中的硅橡胶延长管来施用AB054(9mg/kg),并从硅橡胶延长管中采集血样。每天测量每只动物的全血细胞计数,包括红细胞计数和血细胞比容,包括实验前后,并且在任何实验日计算出的失血量均不超过总血容量的4%。

[0557] 血样收集

[0558] 在每次实验的开始(0分钟)和结束(60分钟),在移植装置近端收集全身血样(1mL),从AV分流的中流进入1/10体积的3.2%柠檬酸盐抗凝剂。在第3周和第4周给药AB054

之前,采集另外的样品。为了测量ACT,收集0.2mL全血并立即进行分析。为了测量CBC,将0.25mL全血收集到涂覆有K2-EDTA的试管中,并在Hemavet 950FS上进行分析。

[0559] 止血评估

[0560] 使用标准模板皮肤出血时间测试(Surgicutt®,International Technidyne Corp, Piscataway,NJ)来评估试验物对狒狒的初期止血的效果。灌注实验开始后15分钟,由同一位专业技术人员进行所有出血时间测试。

[0561] 移植物涂覆包衣和组装

[0562] 用马I型胶原蛋白(Chrono-Log Corporation,Haverton,PA)或组织因子(Dade®Innovin®,Siemens Healthcare,Marburg,Germany)涂覆内径为4mm的ePTFE血管移植材料。

[0563] 血小板和纤维蛋白原的放射性标记

[0564] 为了量化血小板沉积,用1mCi的<sup>111</sup>In标记自体狒狒血小板,然后将这些血小板重新注入动物体内,并且在进行实验前使其循环至少1小时,最多4天。使用与Xeleris 3.1软件(GE Healthcare,Chicago,IL)对接的GE-Brivo NM 615,每隔1分钟测定移植物表面上和远端分流节段中与血小板相关的放射性的积累。根据该数据,计算5分钟间隔的血小板积累。

[0565] 在每次研究前10分钟,静脉注射同源的<sup>125</sup>I标记的狒狒纤维蛋白原(5-25μg,4μCi,>90%可凝性)。在实验后至少30天以使附着在血小板上的<sup>111</sup>In衰减后,使用γ计数器(Wizard-3,PerkinElmer,Shelton,CT)评估标记的纤维蛋白原/纤维蛋白进入血栓中。测量沉积在设备中的<sup>125</sup>I放射性并与实验期间采集的血浆样品中可凝的纤维蛋白(原)的放射性进行比较。

[0566] 移植物中的血小板沉积

[0567] 在灌注实验期间实时测量移植物中的血小板沉积。用γ相机每隔1分钟收集辐射数据,并分析测量的CPM原始数据以计算血小板沉积。计算5分钟间隔内的累积血小板沉积。

[0568] 纤维蛋白(原)含量

[0569] 在实验结束时,将带有血栓的移植物和尾巴节段从分流环上切下并保存,直到<sup>111</sup>In放射性衰减(30天以上)。这时,移植物中剩余的唯一放射性是来自标记的纤维蛋白原的<sup>125</sup>I。

[0570] 统计分析

[0571] 使用针对时间和处理因素的双因素方差分析(ANOVA)对胶原蛋白涂覆和组织因子涂覆移植物的完全血栓的实时血小板沉积进行分析,用Bonferroni事后分析与对照进行比较。所有其它测量(aPTT、ACT、终末血小板积聚、终末纤维蛋白含量、出血时间、PT)均使用单因素方差分析进行分析,用Dunnett事后分析与对照进行比较。所有分析均使用GraphPad Prism 5进行。

[0572] 结果

[0573] 为了评估AB054对血栓形成表面的抗血栓形成潜力,合成血管移植设备涂覆有胶原蛋白(接触途径的活化剂)或组织因子(外源途径的引发剂),并将这些设备部署到狒狒的动静脉分流中。

[0574] 对单只狒狒进行重复实验,该狒狒接受三次每周一次的AB054(9mg/kg)注射,如图

19所示。使用aPTT和ACT测量实验过程中的抗凝作用。在灌注实验开始(0分钟)和结束时(60分钟)采集血浆样品。图1中的时间线示出了在7周周期里从每个实验开始时所获得的测量值得出的aPTT数据。图20A-20D示出了在每个实验的开始和结束时按时间点或处理组分组的aPTT和ACT测量值。

[0575] 在每个实验中,通过PT测量和皮肤模板出血时间评估止血。使用在灌注实验的开始和结束时采集的血浆样品来测量PT(图21A-21B)。在灌注实验开始后15分钟进行模板皮肤出血测试(Surgicutt)(图22)。

[0576] 为了评估在血栓形成表面上的血栓积聚,使来自分流的股动脉的血液流经移植物60分钟。实时测量胶原蛋白涂覆的(图23A-23D)和组织因子涂覆的(图24A-24D)移植物所保留的血小板数目。对移植物和尾巴部份以及合并的总血栓均进行了生长中的血栓中的血小板积聚的分析。

[0577] 对于胶原蛋白涂覆的(图25A-25F)和组织因子涂覆的(图26A-26F)移植物,评估了在60分钟时形成的血栓的终末血小板沉积和纤维蛋白含量。如上所述,单独和一起评估了移植物和尾巴。在每次实验的开始和结束时测量全血细胞计数(图27A-27E)。

[0578] 结论

[0579] 这项研究的结果表明,AB054显著降低了由血液暴露于狒狒中胶原蛋白涂覆的血管移植物表面引起的血栓发展。最后一剂之后,AB054的抗血栓形成活性持续至少2周。与AB054的作用机制一致,组织因子引发的血栓发展没有受到抑制。没有观察到凝血酶原或模板出血时间的明显变化。

[0580] 鉴于可以将本公开的原理应用于许多可能的实施方式,应当认识到,示出的实施例仅是本公开的优选示例,并且不应被视为限制本发明的范围。相反,本发明的范围由所附权利要求书限定。因此,我们要求保护落入这些权利要求的范围和精神内的所有内容作为我们的发明。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 俄勒冈健康与科学大学 & 阿罗诺拉股份有限公司  
 [0003] <120> 治疗性的因子XII抗体  
 [0004] <130> 899-101321-02  
 [0005] <150> US 62/772,235  
 [0006] <151> 2018-11-28  
 [0007] <160> 24  
 [0008] <170> PatentIn version 3.5  
 [0009] <210> 1  
 [0010] <211> 439  
 [0011] <212> PRT  
 [0012] <213> 人工序列  
 [0013] <220>  
 [0014] <223> 合成多肽  
 [0015] <400> 1  
 [0016] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [0017] 1 5 10 15  
 [0018] Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 [0019] 20 25 30  
 [0020] Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Asn Leu Glu Trp  
 [0021] 35 40 45  
 [0022] Met Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu  
 [0023] 50 55 60  
 [0024] Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 [0025] 65 70 75 80  
 [0026] Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [0027] 85 90 95  
 [0028] Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 [0029] 100 105 110  
 [0030] Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
 [0031] 115 120 125  
 [0032] Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val  
 [0033] 130 135 140  
 [0034] Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser  
 [0035] 145 150 155 160  
 [0036] Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu  
 [0037] 165 170 175  
 [0038] Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser  
 [0039] 180 185 190  
 [0040] Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val  
 [0041] 195 200 205

[0042]	Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
[0043]	210 215 220
[0044]	Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0045]	225 230 235 240
[0046]	Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
[0047]	245 250 255
[0048]	Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
[0049]	260 265 270
[0050]	Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[0051]	275 280 285
[0052]	Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
[0053]	290 295 300
[0054]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
[0055]	305 310 315 320
[0056]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
[0057]	325 330 335
[0058]	Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
[0059]	340 345 350
[0060]	Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
[0061]	355 360 365
[0062]	Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
[0063]	370 375 380
[0064]	Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
[0065]	385 390 395 400
[0066]	Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
[0067]	405 410 415
[0068]	Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
[0069]	420 425 430
[0070]	Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
[0071]	435
[0072]	<210> 2
[0073]	<211> 115
[0074]	<212> PRT
[0075]	<213> 人工序列
[0076]	<220>
[0077]	<223> 合成多肽
[0078]	<400> 2
[0079]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0080]	1 5 10 15
[0081]	Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0082]	20 25 30
[0083]	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Asn Leu Glu Trp

[0084]	35	40	45
[0085]	Met Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu		
[0086]	50	55	60
[0087]	Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe		
[0088]	65	70	75 80
[0089]	Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		
[0090]		85	90 95
[0091]	Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr		
[0092]		100	105 110
[0093]	Val Ser Ser		
[0094]	115		
[0095]	<210> 3		
[0096]	<211> 213		
[0097]	<212> PRT		
[0098]	<213> 人工序列		
[0099]	<220>		
[0100]	<223> 合成多肽		
[0101]	<400> 3		
[0102]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly		
[0103]	1	5	10 15
[0104]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met		
[0105]		20	25 30
[0106]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr		
[0107]	35	40	45
[0108]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0109]	50	55	60
[0110]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Gly		
[0111]	65	70	75 80
[0112]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr		
[0113]		85	90 95
[0114]	Phe Gly Gly Gly Thr Ile Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro		
[0115]		100	105 110
[0116]	Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly		
[0117]		115	120 125
[0118]	Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn		
[0119]		130	135 140
[0120]	Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn		
[0121]	145	150	155 160
[0122]	Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser		
[0123]		165	170 175
[0124]	Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr		
[0125]		180	185 190

[0126]	Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
[0127]	195 200 205
[0128]	Asn Arg Asn Glu Cys
[0129]	210
[0130]	<210> 4
[0131]	<211> 106
[0132]	<212> PRT
[0133]	<213> 人工序列
[0134]	<220>
[0135]	<223> 合成多肽
[0136]	<400> 4
[0137]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0138]	1 5 10 15
[0139]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
[0140]	20 25 30
[0141]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0142]	35 40 45
[0143]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0144]	50 55 60
[0145]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Gly
[0146]	65 70 75 80
[0147]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr
[0148]	85 90 95
[0149]	Phe Gly Gly Gly Thr Ile Leu Glu Ile Lys
[0150]	100 105
[0151]	<210> 5
[0152]	<211> 1317
[0153]	<212> DNA
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>
[0156]	<223> 合成核酸
[0157]	<400> 5
[0158]	gatgtgcagc ttcaggagtc aggacctgac ctggtgaaac cttctcagtc actttcactc 60
[0159]	acctgcactg tcaactggcta ctccatcacc agtgggtata gctggcactg gatccggcag 120
[0160]	tttcaggaa acaatctgga atggatgggc tacatacagt acagtggtaa cactaattcc 180
[0161]	aaccatctc tcaaaagtgc aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
[0162]	ctgcatttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attattgtgc aagatggggg 300
[0163]	tcctttgact actggggcca aggcaccact ctacagtct cctcagccaa aacgacaccc 360
[0164]	ccatctgtct atccactggc ccctggatct gctgccc aaa ctaactccat ggtgacctg 420
[0165]	ggatgcctgg tcaagggcta tttccctgag ccagtgcagc tgacctggaa ctctggatcc 480
[0166]	ctgtccagcg gtgtgcacac cttcccagct gtcctgcagt ctgacctcta cactctgagc 540
[0167]	agctcagtgat ctgtcccctc cagcacctgg cccagcgaga ccgtcacctg caacgttgcc 600

[0168]	cacccggcca gcagcaccaa ggtggacaag aaaattgtgc ccagggattg tggttgtaag 660
[0169]	ccttgcataat gtacagtccc agaggtatca tctgtcttca tcttcccccc aaagcccaag 720
[0170]	gatgtgctca ccattactct gactcetaag gtcacgtgtg ttgtggtaga catcagcaag 780
[0171]	gatgatcccc aggtccagtt cagctggitt gtagatgatg tggaggtgca cacagctcag 840
[0172]	acgcaacccc gggaggagca gttcaacagc actttccgct cagtcaagtga acttcccatc 900
[0173]	atgaccagg actggctcaa tggcaaggag ttcaaatgca gggtaacag tgcagctttc 960
[0174]	cctgccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaaggca gaccgaaggc tccacaggtg 1020
[0175]	tacaccattc cacctcccaa ggagcagatg gccaaaggata aagtcaagtct gacctgcatg 1080
[0176]	ataacagact tcttccctga agacattact gtggagtggc agtggaatgg gcagccagcg 1140
[0177]	gagaactaca agaactca gccatcatg gacacagatg gctcttactt cgtctacagc 1200
[0178]	aagtcaatg tgcagaagag caactgggag gcaggaaata ctttcacctg ctctgtgtta 1260
[0179]	catgagggcc tgcacaacca ccatactgag aagagcctct cccactctcc tggtaaa 1317
[0180]	<210> 6
[0181]	<211> 639
[0182]	<212> DNA
[0183]	<213> 人工序列
[0184]	<220>
[0185]	<223> 合成核酸
[0186]	<400> 6
[0187]	caaattgttc tcaccagtc tccagctatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
[0188]	atgacctgca gtgccagctc aagtgtaaat tacatgcaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
[0189]	acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
[0190]	ttcagtggca gtgggtctgg gacctctac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgga 240
[0191]	gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggttaacc caccgacgtt cgggtggaggc 300
[0192]	accatactgg aatcaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 360
[0193]	agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc 420
[0194]	aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac 480
[0195]	agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg 540
[0196]	accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca 600
[0197]	acttcacca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgt 639
[0198]	<210> 7
[0199]	<211> 441
[0200]	<212> PRT
[0201]	<213> 人工序列
[0202]	<220>
[0203]	<223> 合成多肽
[0204]	<400> 7
[0205]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0206]	1                    5                                    10                                    15
[0207]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0208]	20                                    25                                    30
[0209]	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

[0210]	35	40	45
[0211]	Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu		
[0212]	50	55	60
[0213]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
[0214]	65	70	75
[0215]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0216]	85	90	95
[0217]	Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0218]	100	105	110
[0219]	Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
[0220]	115	120	125
[0221]	Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
[0222]	130	135	140
[0223]	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
[0224]	145	150	155
[0225]	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
[0226]	165	170	175
[0227]	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
[0228]	180	185	190
[0229]	Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
[0230]	195	200	205
[0231]	Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys		
[0232]	210	215	220
[0233]	Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0234]	225	230	235
[0235]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[0236]	245	250	255
[0237]	Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp		
[0238]	260	265	270
[0239]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[0240]	275	280	285
[0241]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[0242]	290	295	300
[0243]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[0244]	305	310	315
[0245]	Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[0246]	325	330	335
[0247]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu		
[0248]	340	345	350
[0249]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0250]	355	360	365
[0251]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		

[0252]	370	375	380
[0253]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0254]	385	390	395 400
[0255]	Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn		
[0256]		405	410 415
[0257]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0258]		420	425 430
[0259]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[0260]		435	440
[0261]	<210> 8		
[0262]	<211> 115		
[0263]	<212> PRT		
[0264]	<213> 人工序列		
[0265]	<220>		
[0266]	<223> 合成多肽		
[0267]	<400> 8		
[0268]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
[0269]	1	5	10 15
[0270]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly		
[0271]		20	25 30
[0272]	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0273]		35	40 45
[0274]	Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu		
[0275]		50	55 60
[0276]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
[0277]		65	70 75 80
[0278]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0279]		85	90 95
[0280]	Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0281]		100	105 110
[0282]	Val Ser Ser		
[0283]		115	
[0284]	<210> 9		
[0285]	<211> 213		
[0286]	<212> PRT		
[0287]	<213> 人工序列		
[0288]	<220>		
[0289]	<223> 合成多肽		
[0290]	<400> 9		
[0291]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0292]	1	5	10 15
[0293]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu		

[0294]	20	25	30
[0295]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr		
[0296]	35	40	45
[0297]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0298]	50	55	60
[0299]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
[0300]	65	70	75
[0301]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr		
[0302]	85	90	95
[0303]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
[0304]	100	105	110
[0305]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
[0306]	115	120	125
[0307]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0308]	130	135	140
[0309]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
[0310]	145	150	155
[0311]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
[0312]	165	170	175
[0313]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
[0314]	180	185	190
[0315]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
[0316]	195	200	205
[0317]	Asn Arg Gly Glu Cys		
[0318]	210		
[0319]	<210> 10		
[0320]	<211> 106		
[0321]	<212> PRT		
[0322]	<213> 人工序列		
[0323]	<220>		
[0324]	<223> 合成多肽		
[0325]	<400> 10		
[0326]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0327]	1	5	10
[0328]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu		
[0329]	20	25	30
[0330]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr		
[0331]	35	40	45
[0332]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0333]	50	55	60
[0334]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
[0335]	65	70	75

[0336]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr	
[0337]		85 90 95
[0338]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0339]		100 105
[0340]	<210> 11	
[0341]	<211> 1329	
[0342]	<212> DNA	
[0343]	<213> 人工序列	
[0344]	<220>	
[0345]	<223> 合成核酸	
[0346]	<400> 11	
[0347]	caggtgcagc tccaggagag cggaccgggt ctggtgaagc ccagccagac cctgagcctg	60
[0348]	acctgcaccg tgagcggcta ctcaatcacc tctggctaca gctggcactg gatcaggcag	120
[0349]	caccccgga aggccctgga gtgattggc tatatccagt acagcggcaa caccaacagc	180
[0350]	aacccagcc tcaagagcag ggtgaccatc agcagggata caagcaagaa ccagttcagc	240
[0351]	ctgaagctga gcagcgtgac cgccgtgac accgccgtgt actactgcgc caggtggggc	300
[0352]	agcttcgact actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt cttctgctag caccaagggc	360
[0353]	cccagcgtgt ttctctctgc tccctgcagc cggagacat ccgagagcac cgctgctctg	420
[0354]	ggctgtctcg tgaaggacta cttccctgaa cccgtcaccg tcagctggaa tagcggcgcc	480
[0355]	ctgacatccg gegtccacac attccccgct gtctgcaga gcagcggcct gtacagcctg	540
[0356]	agctccgtgg tcaccgtgc tagcagcagc ctgggaacaa agacctacac ctgcaacgtg	600
[0357]	gaccataagc cctccaacac caaggtggac aagcgggtgg aatccaagta tggaccccc	660
[0358]	tgctctctctt gccctgctcc tgaattctc ggaggcccct ccgtcttctc gtttcccc	720
[0359]	aagcccaagg acacctgat gatctcccg acaccgaag tcacctgcgt cgtggtggat	780
[0360]	gtcagccagg aagatcccga ggtgcagttc aactggtacg tggacggagt ggaggtgcat	840
[0361]	aacgcaaaa ccaagcccag ggaagagcag ttcaacagca cctatcgggt cgtgtccgtg	900
[0362]	ctcaccgtcc tgcatcagga ttggctcaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac	960
[0363]	aaggcctgc cctctccat cgagaagacc atctccaagg ctaaggcca acctcgggag	1020
[0364]	ccccagtgt atacctccc tcccagccag gaggagatga ccaagaatca agtgagcctg	1080
[0365]	acctgcctcg tgaaggatt ttaccctcc gacatcgtg tggaatggga aagcaatggc	1140
[0366]	caacctgaga acaactaaa gaccacacc cccgtgctgg actccgatgg ctcttcttc	1200
[0367]	ctgtacagca ggctgaccgt ggacaaatcc cgggtggcaag agggaaacgt gttcagctg	1260
[0368]	tccgtgatgc acgagctct ccacaaccac tacaccaga agagcctctc cctgagcctc	1320
[0369]	ggctagtaa	1329
[0370]	<210> 12	
[0371]	<211> 642	
[0372]	<212> DNA	
[0373]	<213> 人工序列	
[0374]	<220>	
[0375]	<223> 合成核酸	
[0376]	<400> 12	
[0377]	gagatcgtgc tgaccagag cccagcaacc ctgagcttga gccccgtga gagggccacc	60



[0420]	195	200	205
[0421]	Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys		
[0422]	210	215	220
[0423]	Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0424]	225	230	240
[0425]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[0426]	245	250	255
[0427]	Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp		
[0428]	260	265	270
[0429]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[0430]	275	280	285
[0431]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[0432]	290	295	300
[0433]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[0434]	305	310	320
[0435]	Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[0436]	325	330	335
[0437]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu		
[0438]	340	345	350
[0439]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0440]	355	360	365
[0441]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0442]	370	375	380
[0443]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0444]	385	390	400
[0445]	Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn		
[0446]	405	410	415
[0447]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0448]	420	425	430
[0449]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[0450]	435	440	
[0451]	<210> 14		
[0452]	<211> 115		
[0453]	<212> PRT		
[0454]	<213> 人工序列		
[0455]	<220>		
[0456]	<223> 合成多肽		
[0457]	<400> 14		
[0458]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
[0459]	1	5	10
[0460]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly		
[0461]	20	25	30

[0462]	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0463]	35 40 45
[0464]	Met Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu
[0465]	50 55 60
[0466]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0467]	65 70 75 80
[0468]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0469]	85 90 95
[0470]	Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[0471]	100 105 110
[0472]	Val Ser Ser
[0473]	115
[0474]	<210> 15
[0475]	<211> 441
[0476]	<212> PRT
[0477]	<213> 人工序列
[0478]	<220>
[0479]	<223> 合成多肽
[0480]	<400> 15
[0481]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[0482]	1 5 10 15
[0483]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0484]	20 25 30
[0485]	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0486]	35 40 45
[0487]	Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu
[0488]	50 55 60
[0489]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0490]	65 70 75 80
[0491]	Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0492]	85 90 95
[0493]	Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
[0494]	100 105 110
[0495]	Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
[0496]	115 120 125
[0497]	Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
[0498]	130 135 140
[0499]	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
[0500]	145 150 155 160
[0501]	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
[0502]	165 170 175
[0503]	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

[0504]	180	185	190
[0505]	Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
[0506]	195	200	205
[0507]	Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys		
[0508]	210	215	220
[0509]	Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0510]	225	230	235 240
[0511]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[0512]	245	250	255
[0513]	Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp		
[0514]	260	265	270
[0515]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[0516]	275	280	285
[0517]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[0518]	290	295	300
[0519]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[0520]	305	310	315 320
[0521]	Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[0522]	325	330	335
[0523]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu		
[0524]	340	345	350
[0525]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0526]	355	360	365
[0527]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0528]	370	375	380
[0529]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0530]	385	390	395 400
[0531]	Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn		
[0532]	405	410	415
[0533]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0534]	420	425	430
[0535]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[0536]	435	440	
[0537]	<210> 16		
[0538]	<211> 115		
[0539]	<212> PRT		
[0540]	<213> 人工序列		
[0541]	<220>		
[0542]	<223> 合成多肽		
[0543]	<400> 16		
[0544]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
[0545]	1	5	10 15

[0546]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0547]	20 25 30
[0548]	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0549]	35 40 45
[0550]	Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu
[0551]	50 55 60
[0552]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0553]	65 70 75 80
[0554]	Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0555]	85 90 95
[0556]	Ala Arg Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
[0557]	100 105 110
[0558]	Val Ser Ser
[0559]	115
[0560]	<210> 17
[0561]	<211> 213
[0562]	<212> PRT
[0563]	<213> 人工序列
[0564]	<220>
[0565]	<223> 合成多肽
[0566]	<400> 17
[0567]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0568]	1 5 10 15
[0569]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu
[0570]	20 25 30
[0571]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0572]	35 40 45
[0573]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0574]	50 55 60
[0575]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0576]	65 70 75 80
[0577]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr
[0578]	85 90 95
[0579]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0580]	100 105 110
[0581]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0582]	115 120 125
[0583]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0584]	130 135 140
[0585]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0586]	145 150 155 160
[0587]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

[0588]		165		170		175
[0589]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala					
[0590]		180		185		190
[0591]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe					
[0592]		195		200		205
[0593]	Asn Arg Gly Glu Cys					
[0594]		210				
[0595]	<210>	18				
[0596]	<211>	106				
[0597]	<212>	PRT				
[0598]	<213>	人工序列				
[0599]	<220>					
[0600]	<223>	合成多肽				
[0601]	<400>	18				
[0602]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
[0603]	1	5		10		15
[0604]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu					
[0605]		20		25		30
[0606]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr					
[0607]		35		40		45
[0608]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser					
[0609]		50		55		60
[0610]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu					
[0611]	65	70		75		80
[0612]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr					
[0613]		85		90		95
[0614]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
[0615]		100		105		
[0616]	<210>	19				
[0617]	<211>	213				
[0618]	<212>	PRT				
[0619]	<213>	人工序列				
[0620]	<220>					
[0621]	<223>	合成多肽				
[0622]	<400>	19				
[0623]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
[0624]	1	5		10		15
[0625]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu					
[0626]		20		25		30
[0627]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr					
[0628]		35		40		45
[0629]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser					

[0630]	50	55	60
[0631]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
[0632]	65	70	75 80
[0633]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr		
[0634]		85	90 95
[0635]	Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
[0636]		100	105 110
[0637]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
[0638]		115	120 125
[0639]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0640]		130	135 140
[0641]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
[0642]		145	150 155 160
[0643]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
[0644]		165	170 175
[0645]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
[0646]		180	185 190
[0647]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
[0648]		195	200 205
[0649]	Asn Arg Gly Glu Cys		
[0650]	210		
[0651]	<210> 20		
[0652]	<211> 106		
[0653]	<212> PRT		
[0654]	<213> 人工序列		
[0655]	<220>		
[0656]	<223> 合成多肽		
[0657]	<400> 20		
[0658]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0659]	1	5	10 15
[0660]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu		
[0661]		20	25 30
[0662]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr		
[0663]		35	40 45
[0664]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0665]		50	55 60
[0666]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
[0667]		65	70 75 80
[0668]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Pro Thr		
[0669]		85	90 95
[0670]	Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
[0671]		100	105

[0672] <210> 21  
 [0673] <211> 1329  
 [0674] <212> DNA  
 [0675] <213> 人工序列  
 [0676] <220>  
 [0677] <223> 合成核酸  
 [0678] <400> 21  
 [0679] gacgtgcagc tccaggagag cggacccggt ctggtgaagc ccagccagac cctgagcctg 60  
 [0680] acctgcaccg tgaccggcta ctcaatcacc tctggctaca gctggcactg gatcaggcag 120  
 [0681] caccgccgca agggcctgga gtggatgggc tatatccagt acagcggcaa caccaacagc 180  
 [0682] aaccacagcc tcaagagcag ggtgaccatc agcagggata caagcaagaa ccagttcagc 240  
 [0683] ctgaagctga gcagcgtgac cgccgctgac accgccgtgt actactgcgc caggtggggc 300  
 [0684] agcttcgact actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt cttctgctag caccaagggc 360  
 [0685] cccagcgtgt ttctctcgc tccctgcagc cggagcacat ccgagagcac cgctgctctg 420  
 [0686] ggctgtctcg tgaaggacta cttccctgaa cccgtcaccg tcagctggaa tagcggcgcc 480  
 [0687] ctgacatccg gcgtccacac attcccgcgt gtctctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540  
 [0688] agctccgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc ctgggaacaa agacctacac ctgcaacgtg 600  
 [0689] gaccataagc cctccaacac caaggtggac aagcgggtgg aatccaagta tggaccccc 660  
 [0690] tgtctctctt gcctgctcc tgaatttctc ggaggcccct ccgtcttctt gtttcccc 720  
 [0691] aagcccaagg acacctgat gatctcccgg acaccgaag tcacctgcgt cgtggtggat 780  
 [0692] gtcagccagg aagatcccga ggtgcagttc aactggtacg tggacggagt ggaggtgcat 840  
 [0693] aacgccaaaa ccaagcccag ggaagagcag ttcaacagca cctatcgggt cgtgtccgtg 900  
 [0694] ctaccgtcc tgcatcagga ttggctcaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac 960  
 [0695] aaggcctgc cctctccat cgagaagacc atctccaagg ctaaggcca acctcgggag 1020  
 [0696] ccccaagtgt atacctccc tcccagccag gaggagatga ccaagaatca agtgagcctg 1080  
 [0697] acctgcctcg tgaaggatt ttaccctcc gacatcgtg tggaaatggga aagcaatggc 1140  
 [0698] caacctgaga acaactacaa gaccacacc cccgtgctgg actccgatgg ctccttcttc 1200  
 [0699] ctgtacagca ggctgaccgt ggacaaatcc cgggtggcaag agggaaacgt gttcagctgc 1260  
 [0700] tccgtgatgc acgagctct ccacaaccac tacaccaga agagcctctc cctgagcctc 1320  
 [0701] ggctagtaa 1329  
 [0702] <210> 22  
 [0703] <211> 642  
 [0704] <212> DNA  
 [0705] <213> 人工序列  
 [0706] <220>  
 [0707] <223> 合成核酸  
 [0708] <400> 22  
 [0709] gagatcgtgc tgaccagag cccagcaacc ctgagcttga gccccggtga gagggccacc 60  
 [0710] ctgtcatgca gggccagcag cagcgtgaac tacctgcaact ggtatcagca gaagcccgtg 120  
 [0711] caagccccca agaggtggat ctacgacacc agcaagctgg ccaccggcat ccccgccagg 180  
 [0712] ttttccggca gcgggtcagg caccgactac accctacca taagcagcct ggagcccagc 240  
 [0713] gacttcgccg tgtactactg tcagcagtggt agcggcaacc cacctacctt tggcggaggc 300

[0714]	actaagggtgg agatcaagcg gaccgtggcc gccccagcg tgttcatctt ccctcccagc	360
[0715]	gacgagcagc tgaagtctgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc	420
[0716]	cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag	480
[0717]	agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	540
[0718]	agcaaggccg actacagaaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggactg	600
[0719]	tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgt aa	642
[0720]	<210>	23
[0721]	<211>	1329
[0722]	<212>	DNA
[0723]	<213>	人工序列
[0724]	<220>	
[0725]	<223>	合成核酸
[0726]	<400>	23
[0727]	gacgtgcagc tccaggagag cggaccgggt ctggtgaagc ccagcgagac cctgagcctg	60
[0728]	acctgcaccg tgagcggcta ctcaatcacc tctggctaca gctggcactg gatcaggcag	120
[0729]	ccaccggca agggcctgga gtggattggc tatatccagt acagcggcaa caccaacagc	180
[0730]	aaccacagcc tcaagagcag ggtgaccatc agcaggata caagcaagaa ccagttcagc	240
[0731]	ctgaggctga gcagcgtgac cgccgctgac accgccgtgt actactgcgc caggtggggc	300
[0732]	agcttcgact actggggcca gggcacctat gtgaccgtgt cttctgctag caccaagggc	360
[0733]	cccagcgtgt ttctctcgc tccctgcagc cggagcact ccgagagcac cgctgctctg	420
[0734]	ggctgtctcg tgaaggacta cttccctgaa cccgtcaccg tcagctggaa tagcggcgcc	480
[0735]	ctgacatccg gcgtccacac attccccgt gtctgcaga gcagcggcct gtacagcctg	540
[0736]	agctccgtgg tcacctgcc tagcagcagc ctgggaacaa agacctacac ctgcaacgtg	600
[0737]	gaccataagc cctccaacac caaggtggac aagcgggtgg aatccaagta tggaccccc	660
[0738]	tgctctcctt gcctgtctc tgaatttctc ggaggcccct ccgttctct gtttcccccc	720
[0739]	aagcccaagg acacctgat gatctcccgg acaccgaag tcacctgcgt cgtggtggat	780
[0740]	gtcagccagg aagatcccga ggtgcagttc aactggtacg tggacggagt ggaggtgcat	840
[0741]	aacgccaaaa ccaagcccag ggaagagcag ttcaacagca cctatcgggt cgtgtccctg	900
[0742]	ctcaccgtcc tgcatcagga ttggtcaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac	960
[0743]	aaggcctgc cctctccat cgagaagacc atctccaagg ctaaggcca acctcgggag	1020
[0744]	ccccagtgt atacctccc tcccagccag gaggagatga ccaagaatca agtgagcctg	1080
[0745]	acctgcctcg tgaaggatt ttaccctcc gacatcgtg tggaatggga aagcaatggc	1140
[0746]	caacctgaga acaactacaa gaccacacc cccgtgctgg actccgatgg ctcttcttc	1200
[0747]	ctgtacagca ggctgaccgt ggacaaatcc cgggtggcaag agggaaacgt gttcagctgc	1260
[0748]	tccgtgatgc acgagctct ccacaaccac tacaccaga agagcctctc cctgagcctc	1320
[0749]	ggctagtaa	1329
[0750]	<210>	24
[0751]	<211>	642
[0752]	<212>	DNA
[0753]	<213>	人工序列
[0754]	<220>	
[0755]	<223>	合成核酸

[0756] <400> 24  
[0757] gacatcgtgc tgaccagac cccagcaacc ctgagcttga gccccggtga gagggccacc 60  
[0758] ctgtcatgca gggccagcag cagcgtgaac tacctgcaact ggtatcagca gaagccccgt 120  
[0759] caagcccca agaggctgat ctacgacacc agcaagctgg ccaccggcat ccccgccagg 180  
[0760] ttttccggca gcgggtcagg caccgactac accctacca taagcagcct ggagcccag 240  
[0761] gacttcgccg tgtactactg tcagcagtgg agcggcaacc cacctacctt tggccagggc 300  
[0762] actaggttgg agatcaagcg gaccgtggcc gccccagcg tgttcatett ccctcccage 360  
[0763] gacgagcagc tgaagtctgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420  
[0764] cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480  
[0765] agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540  
[0766] agcaaggccg actacgagaa gcacaagtg tacgctgcg aggtgaccca ccagggactg 600  
[0767] tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtget aa 642

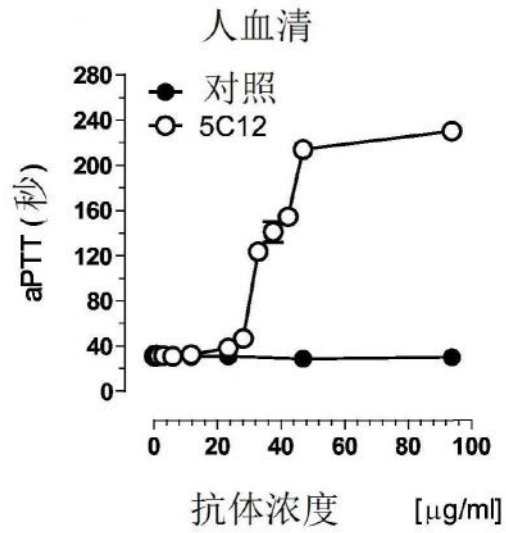


图1A

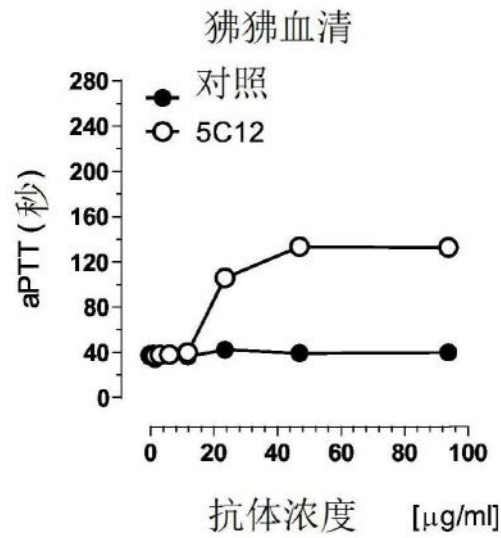


图1B

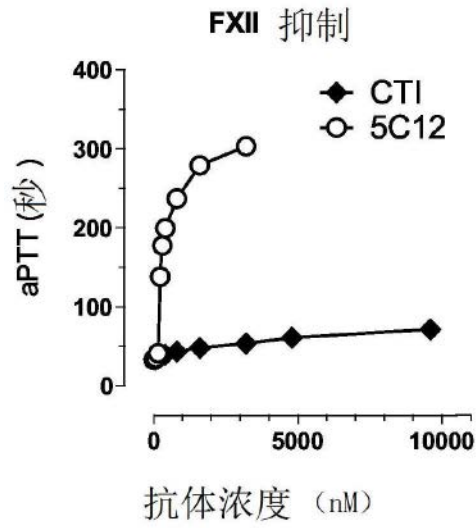


图1C

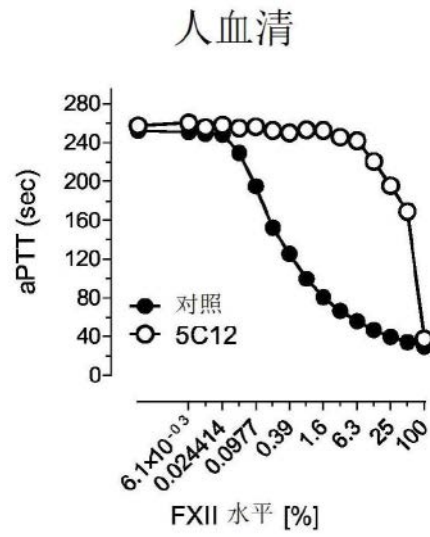


图2A

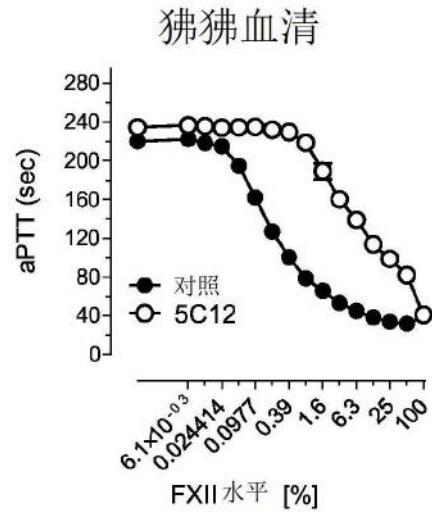


图2B

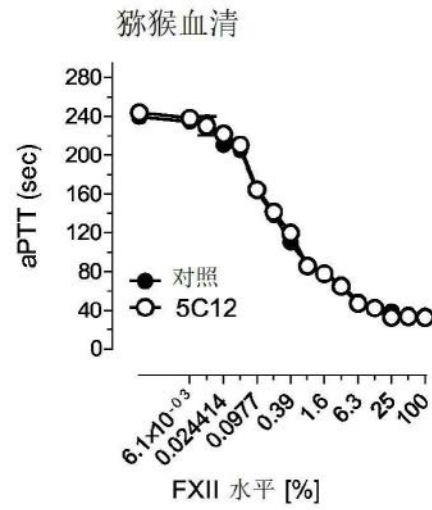


图2C

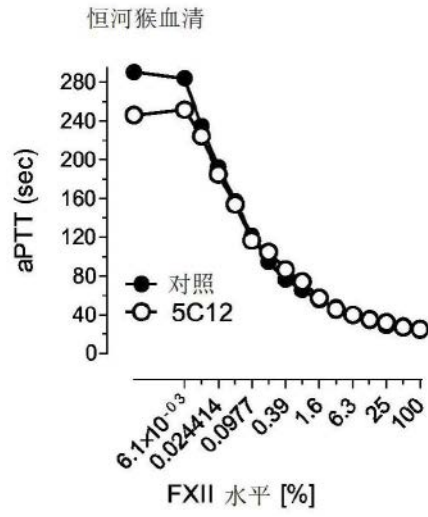


图2D

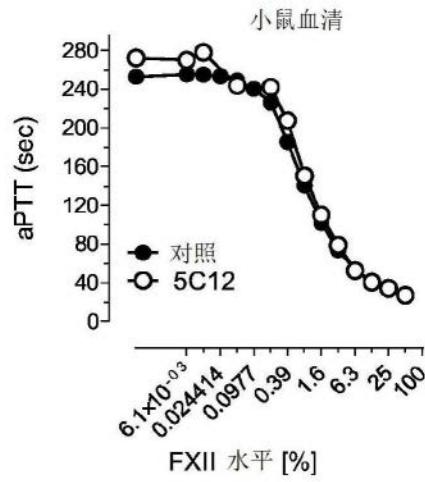


图2E

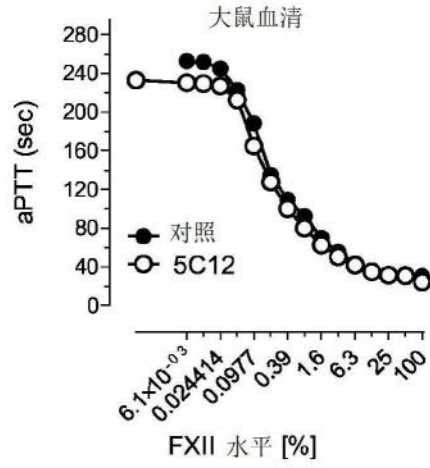


图2F

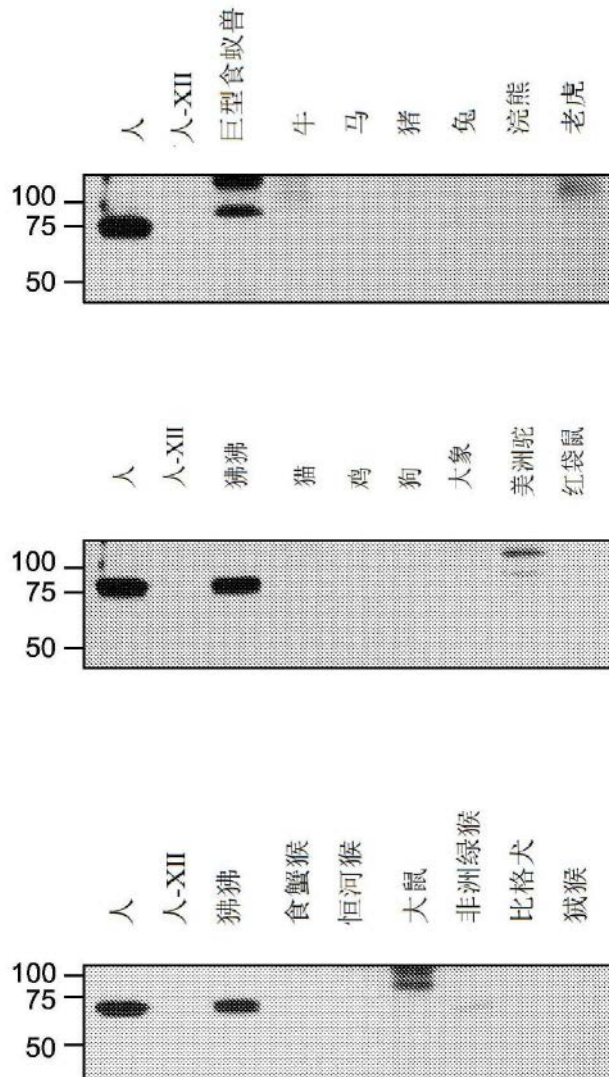


图3A

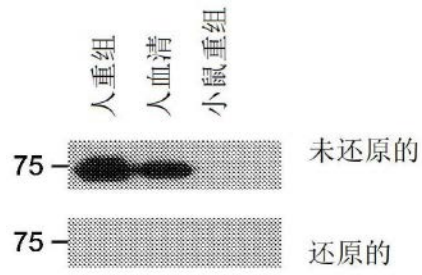


图3B

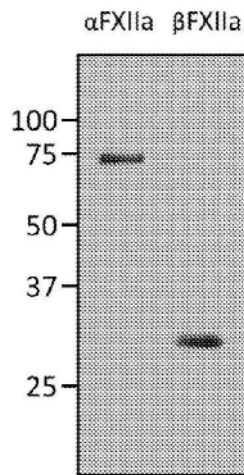


图3C

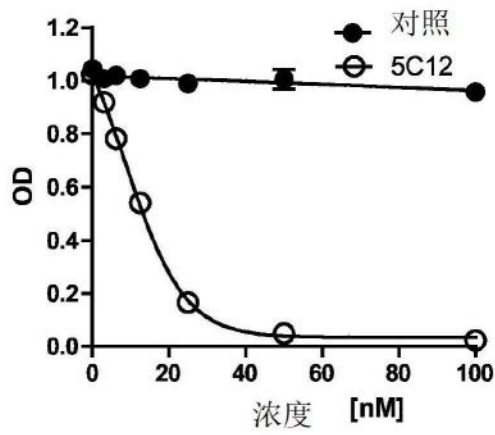


图4A

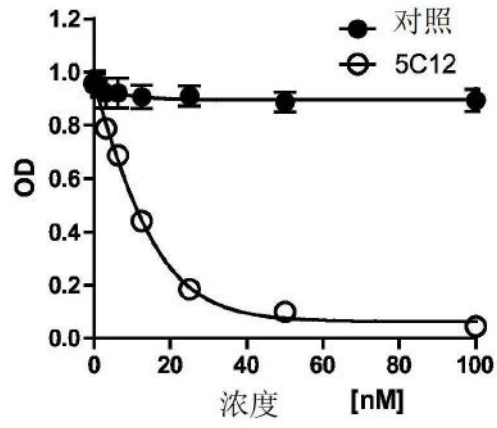


图4B

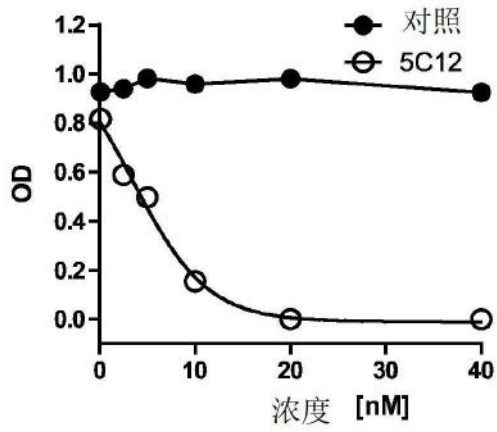


图4C

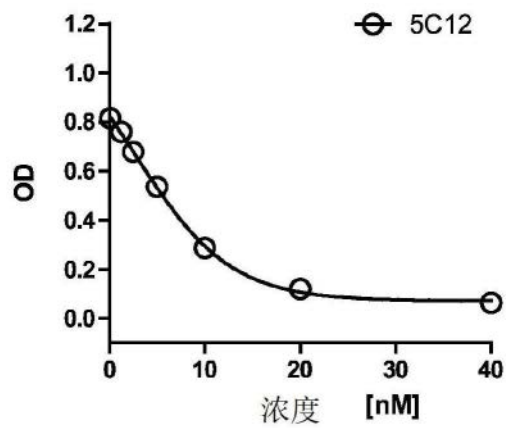


图4D

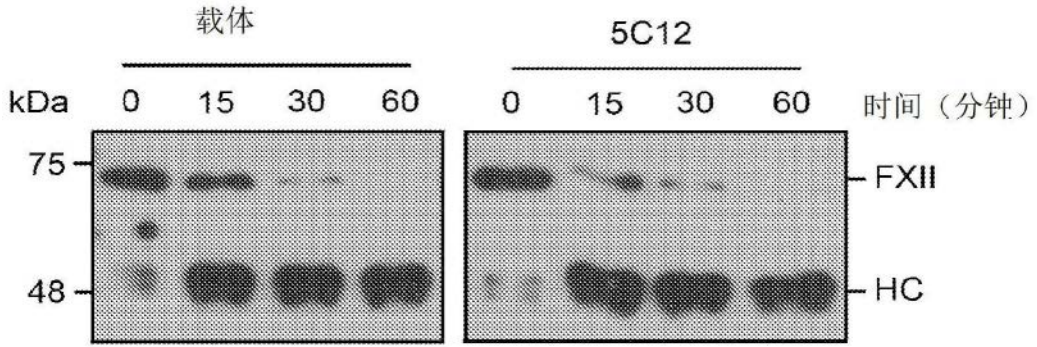


图4E

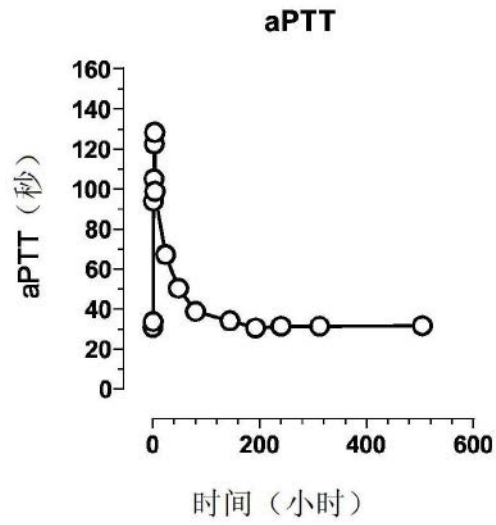


图5A

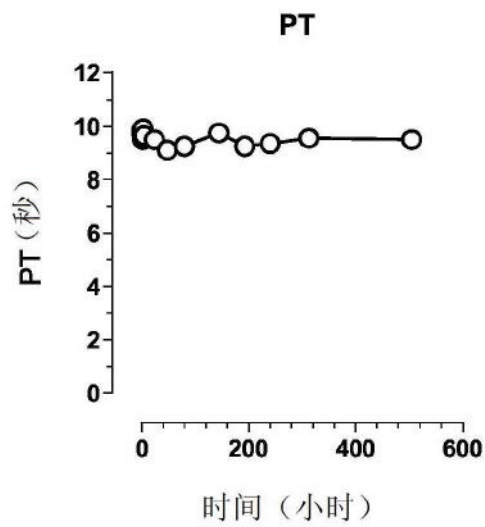


图5B

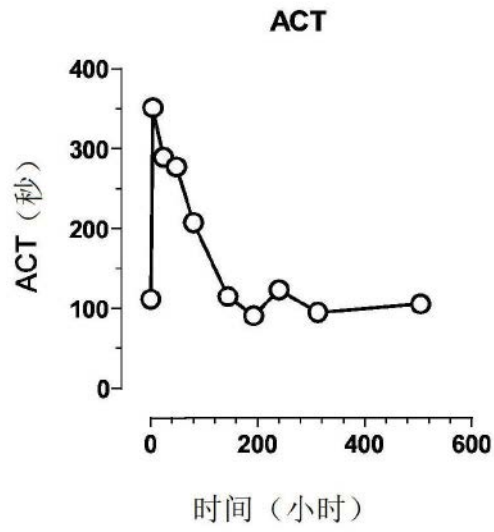


图5C

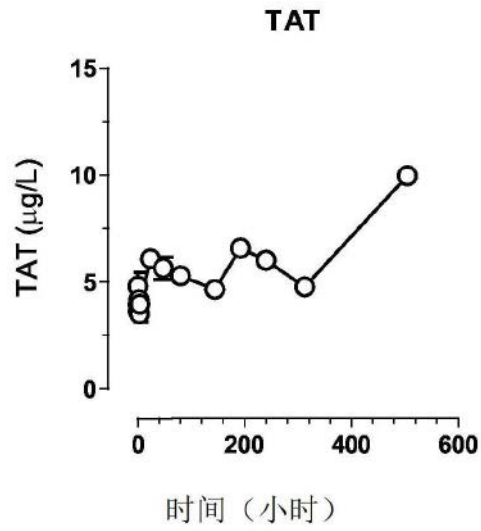


图5D

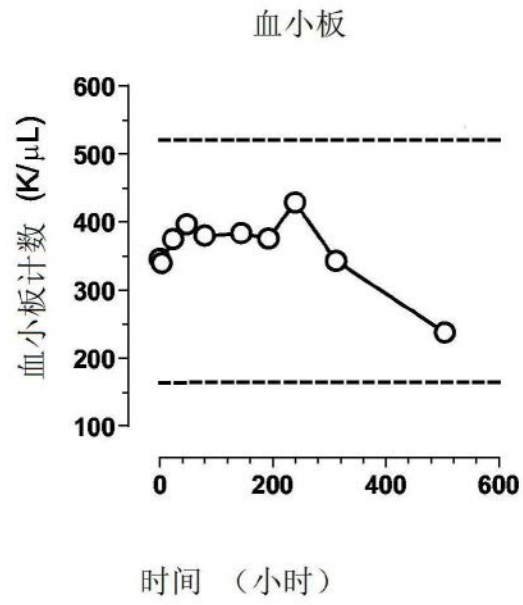


图5E

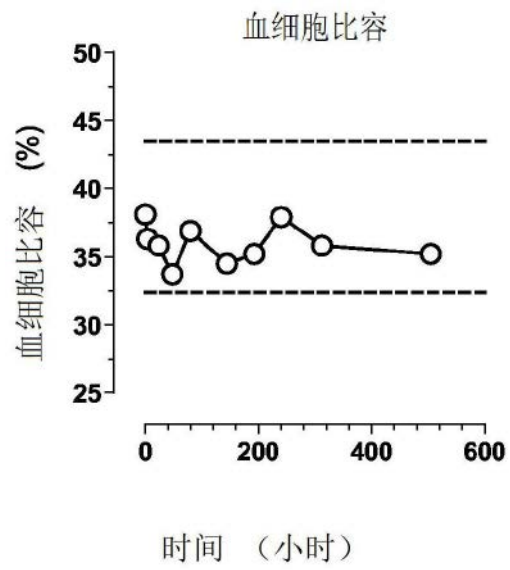


图5F

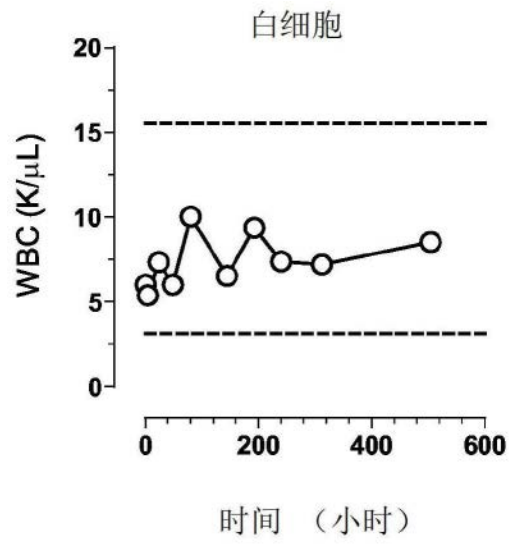


图5G

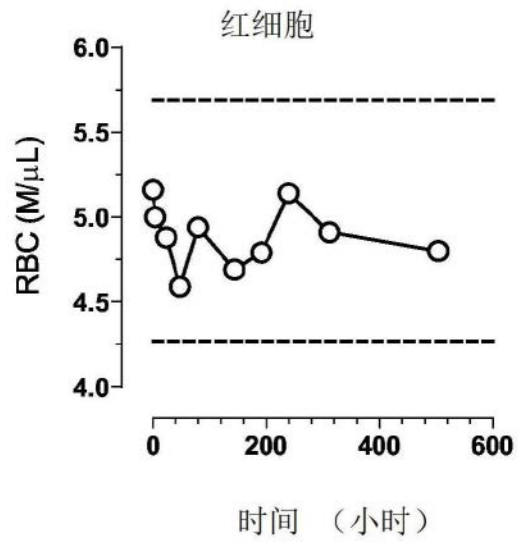


图5H

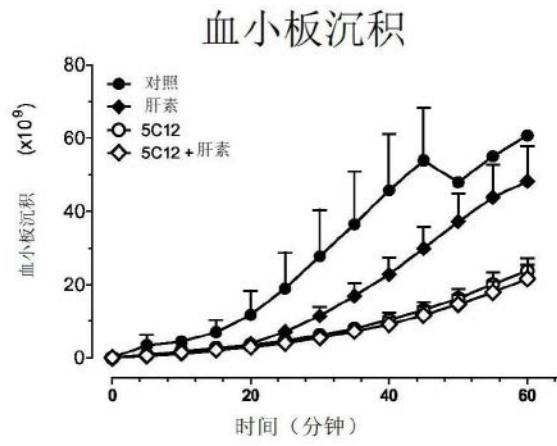


图6A

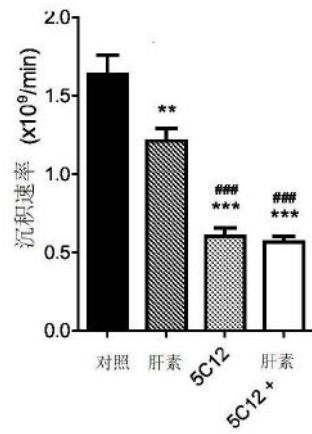


图6B

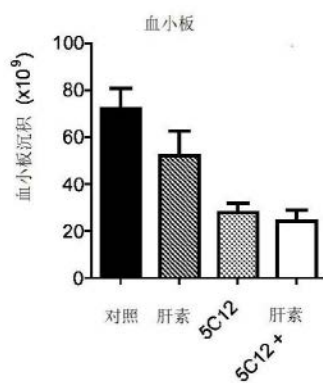


图6C

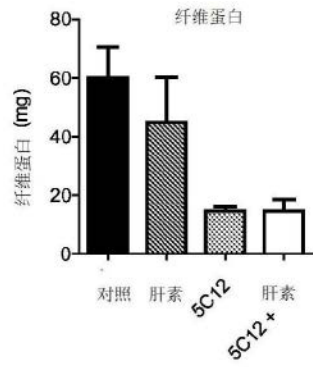


图6D

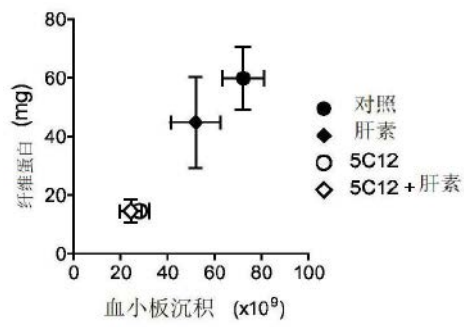


图6E

aPTT

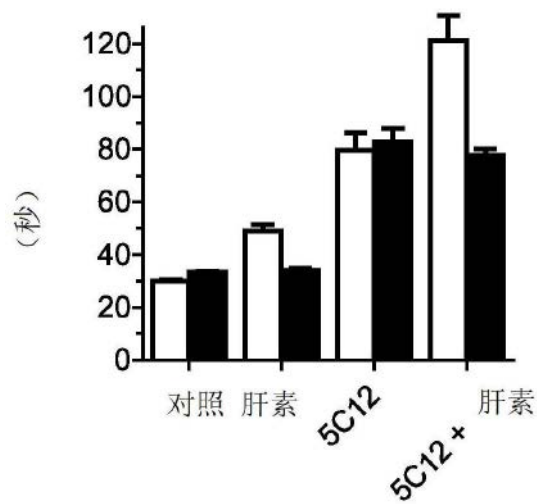


图7A

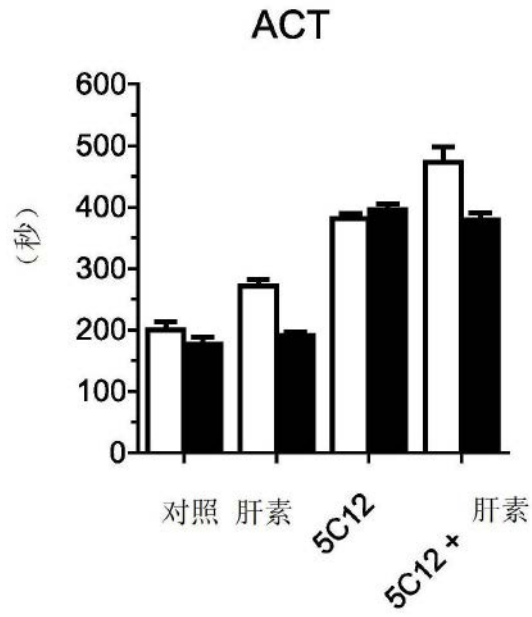


图7B

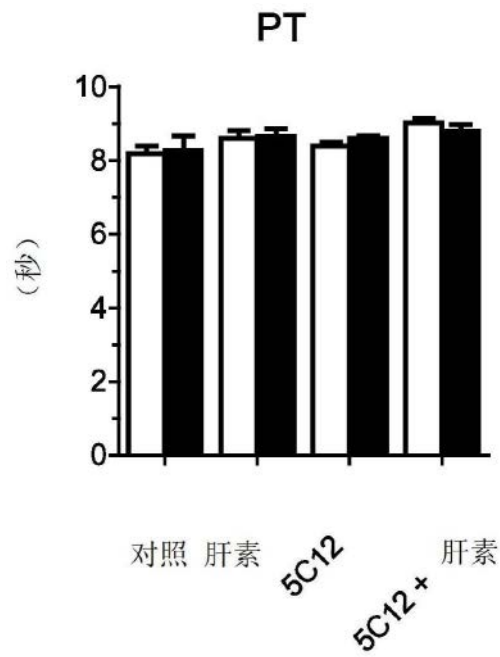


图7C

凝血酶-抗凝血酶

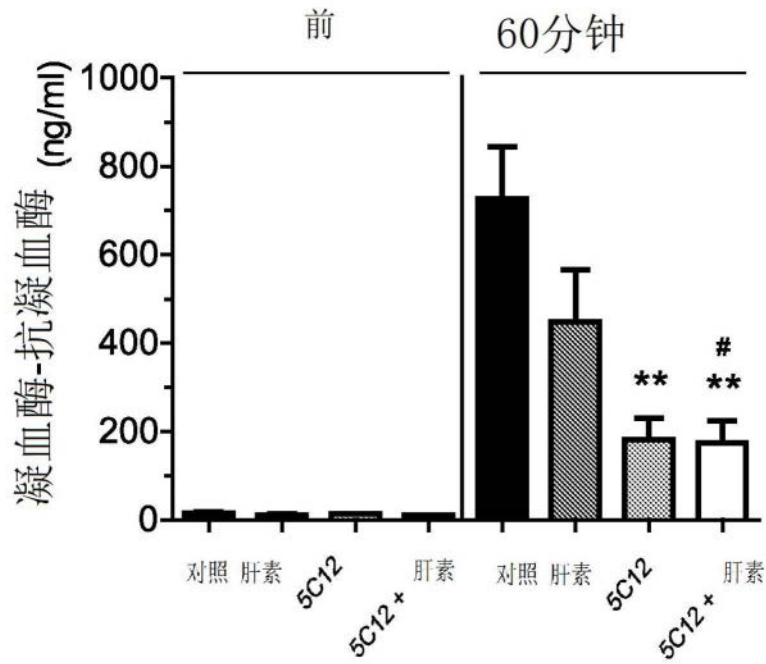


图8A

血小板因子4

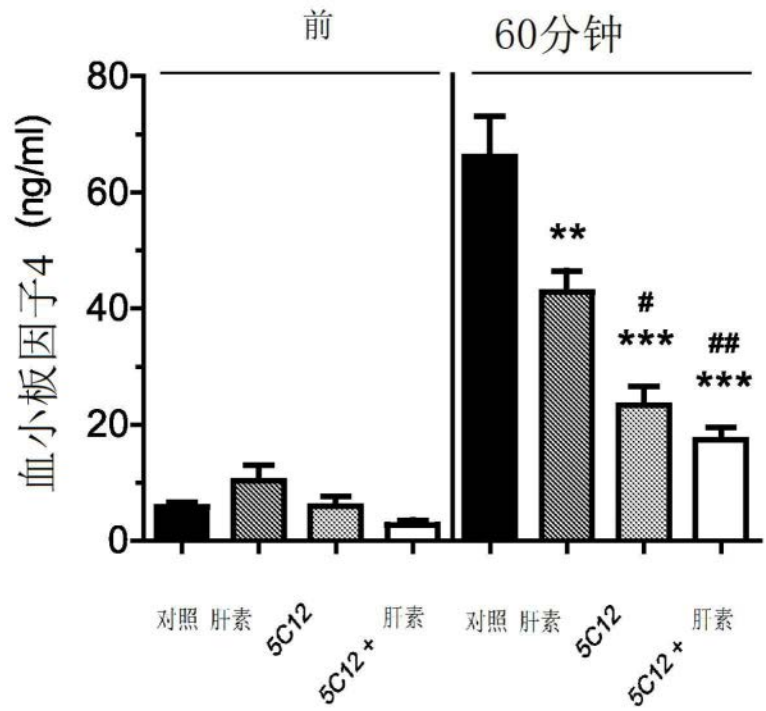


图8B

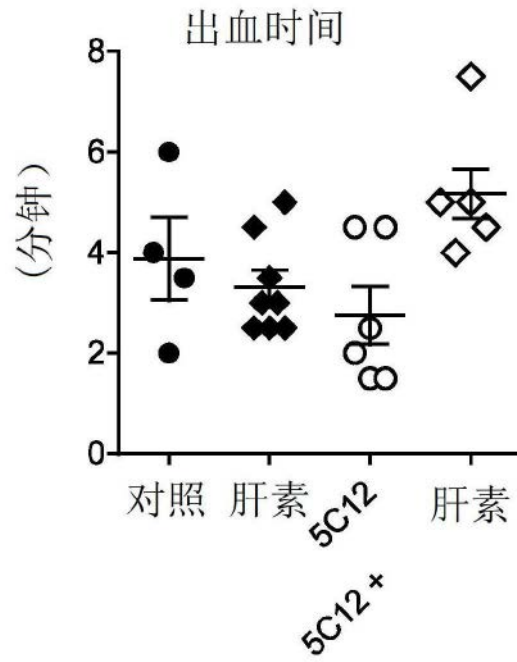


图9A

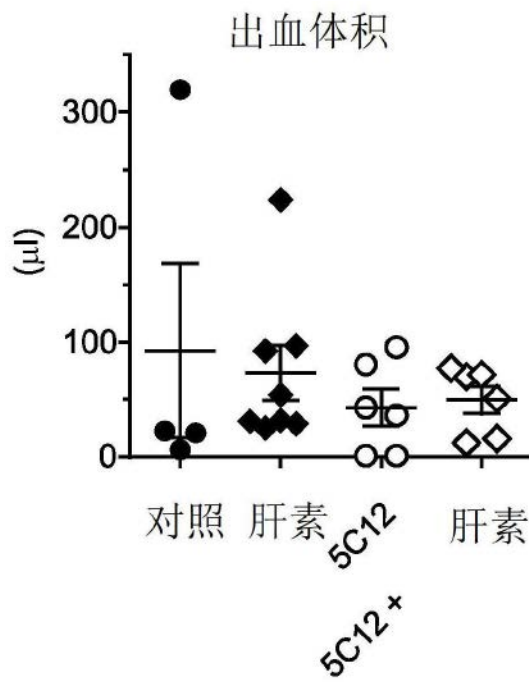


图9B

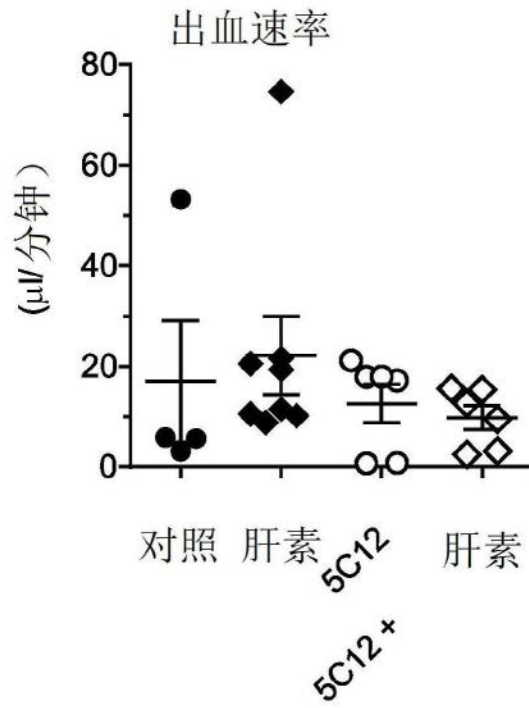


图9C

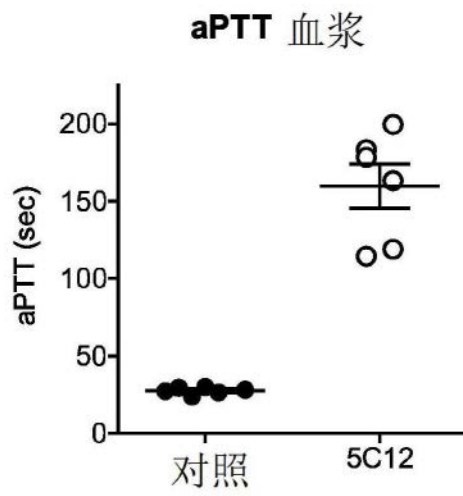


图10A

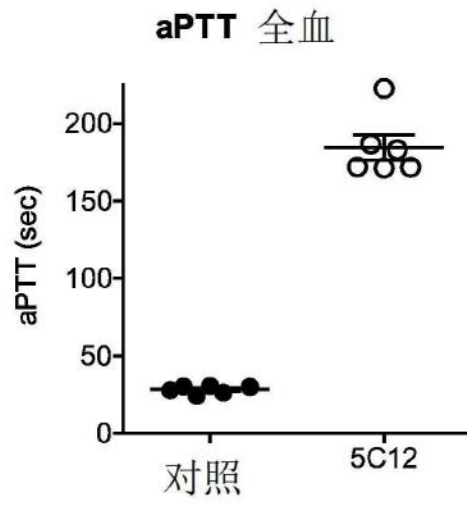


图10B

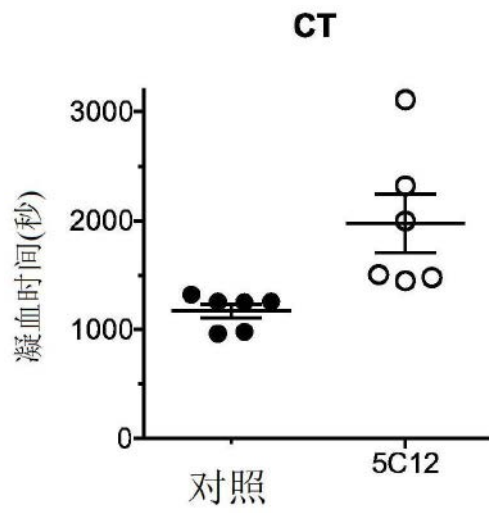


图10C

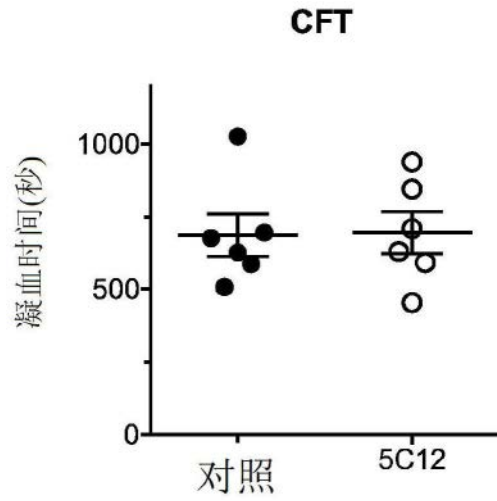


图10D

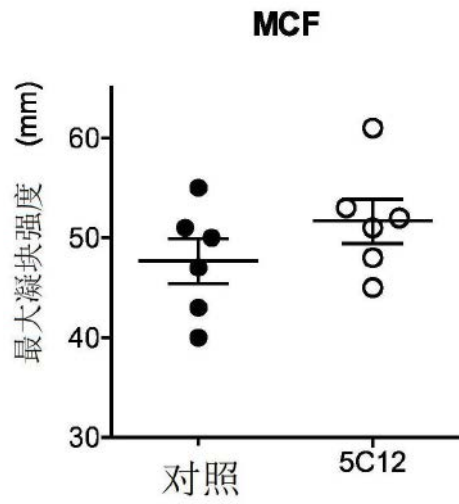


图10E

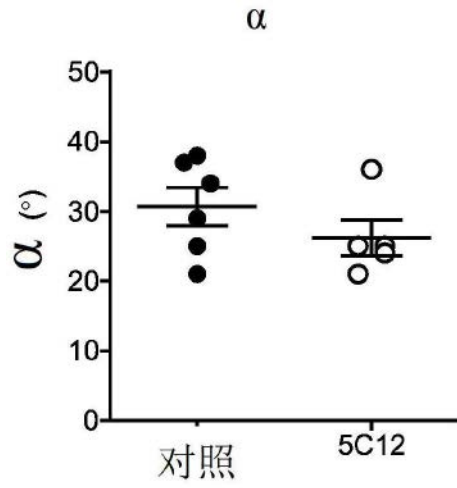


图10F

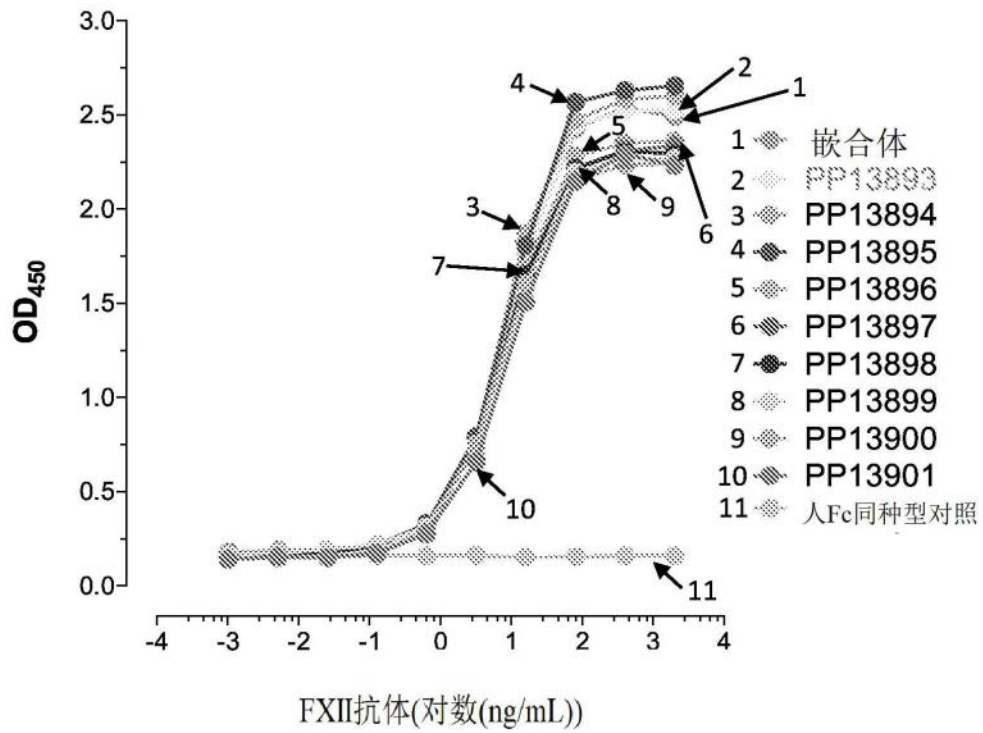


图11

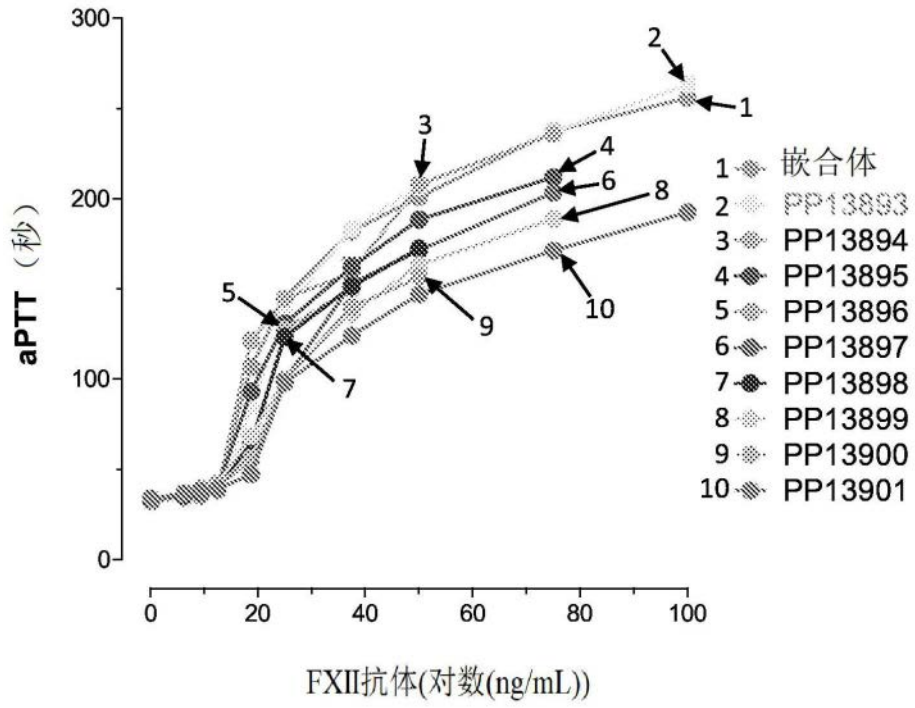


图12

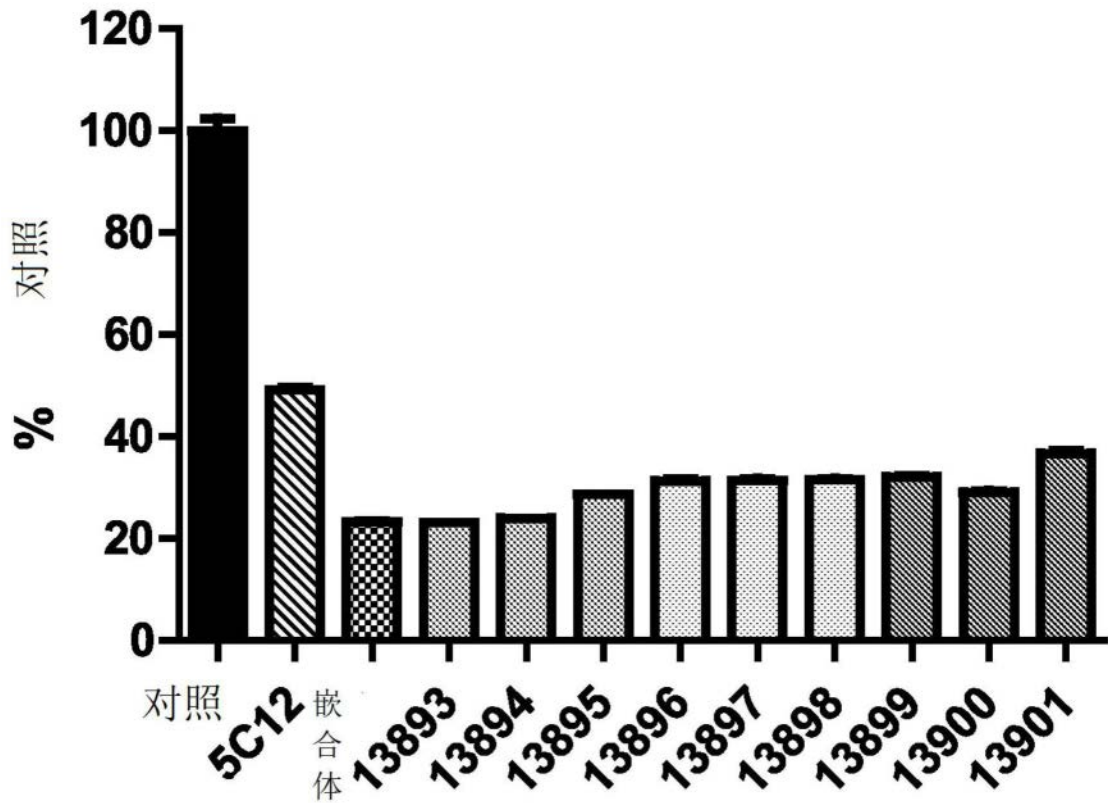


图13

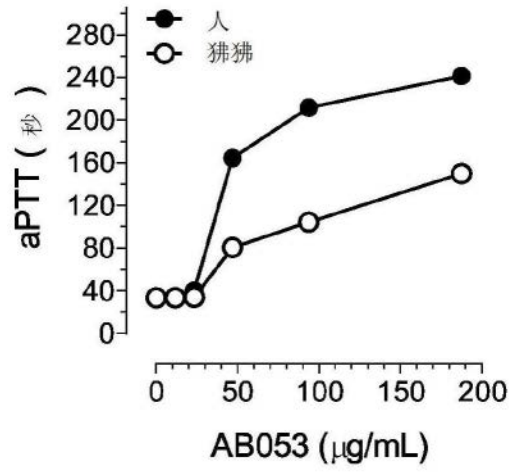


图14A

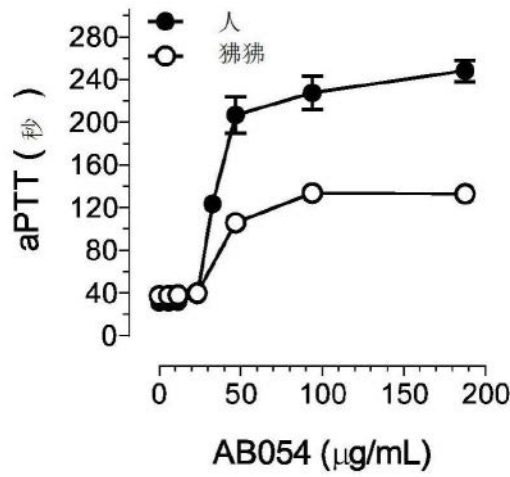


图14B

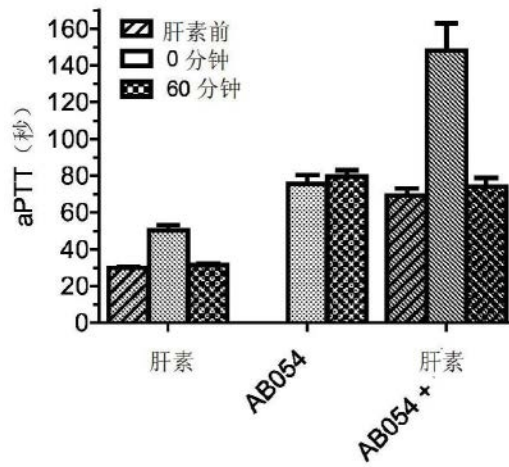


图15A

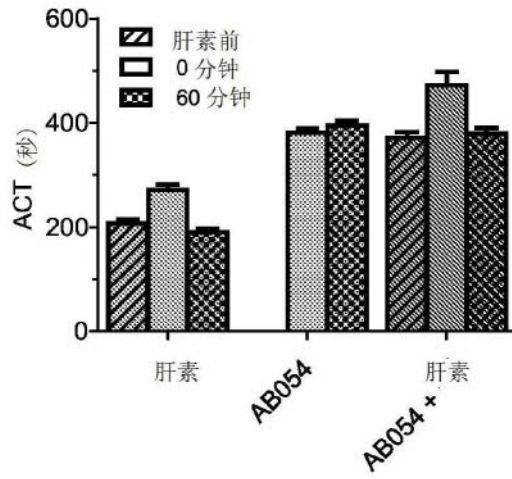


图15B

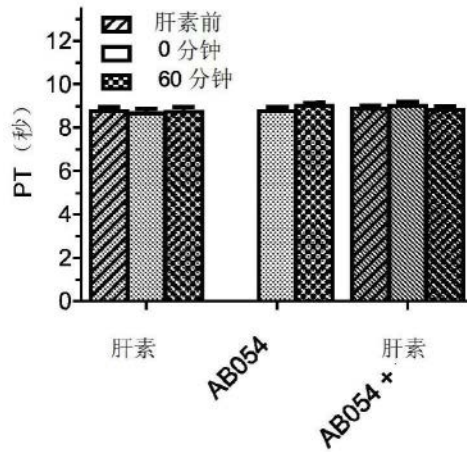


图15C

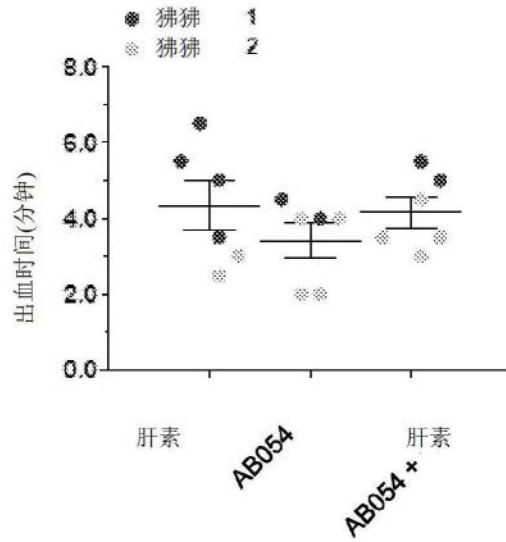


图16A

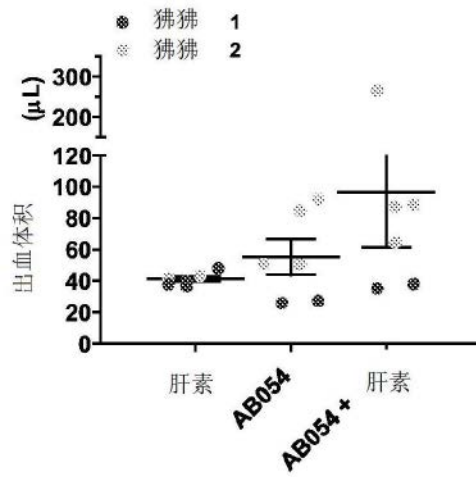


图16B

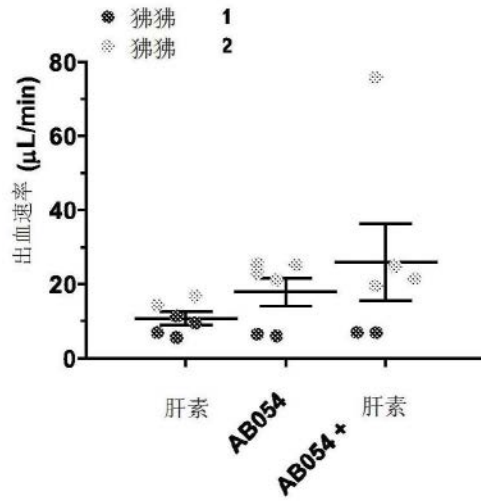


图16C

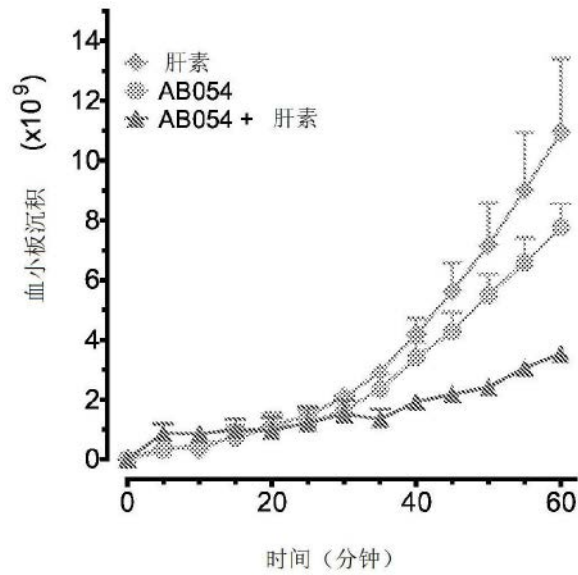


图17A

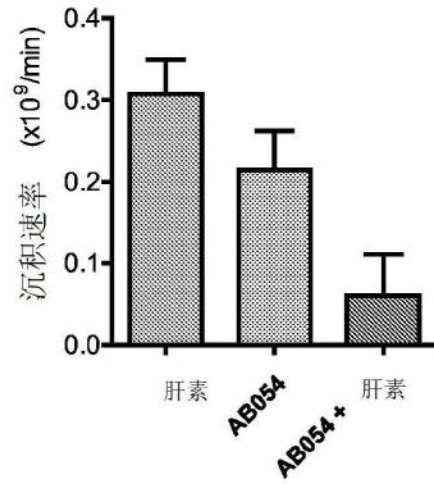


图17B

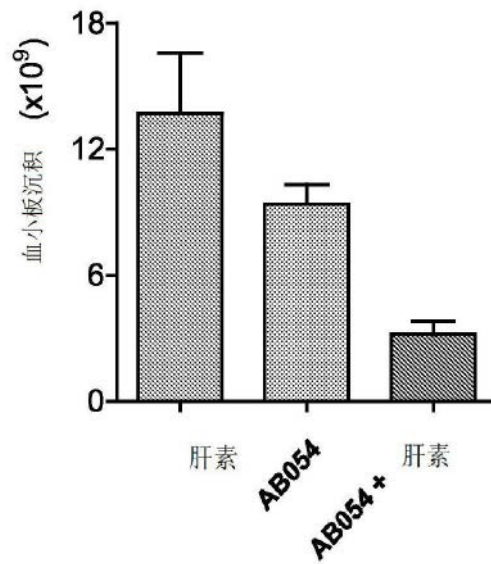


图18A

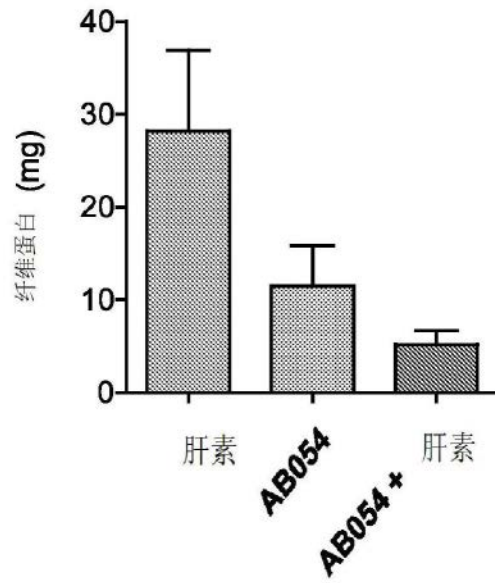


图18B

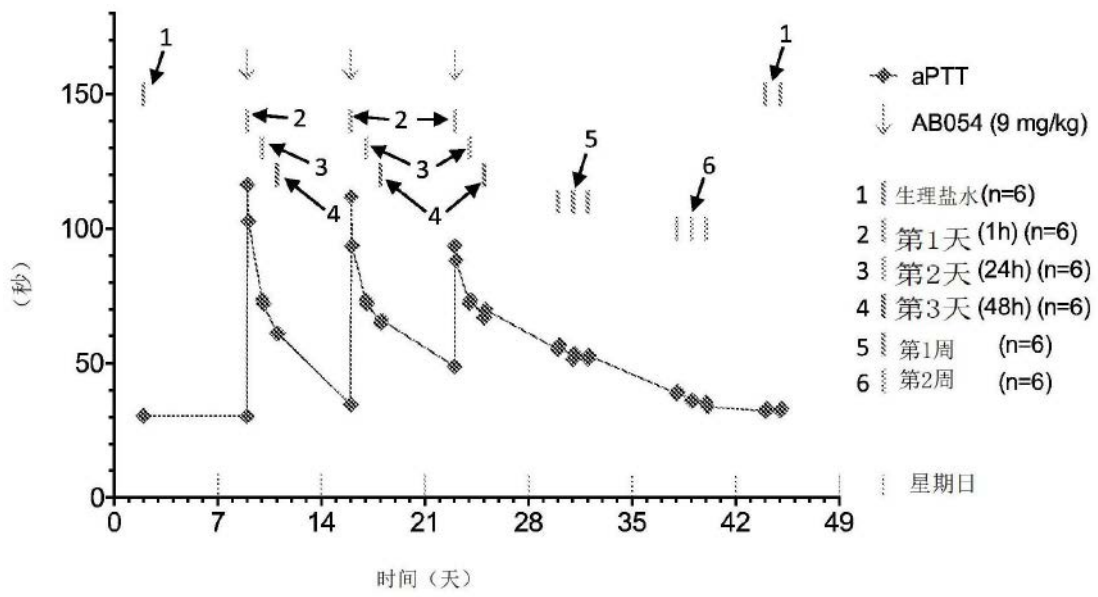


图19

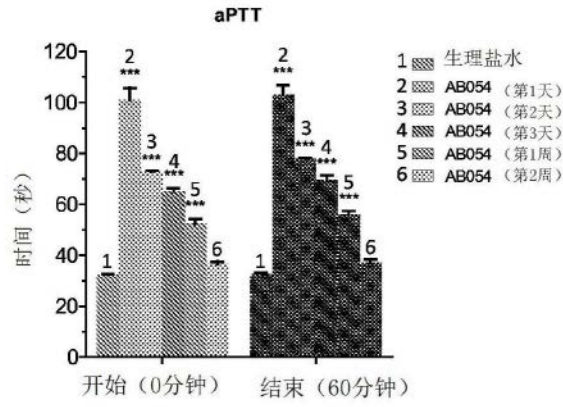


图20A

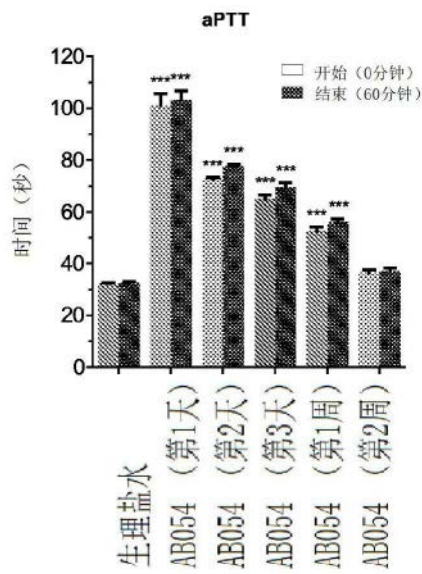


图20B

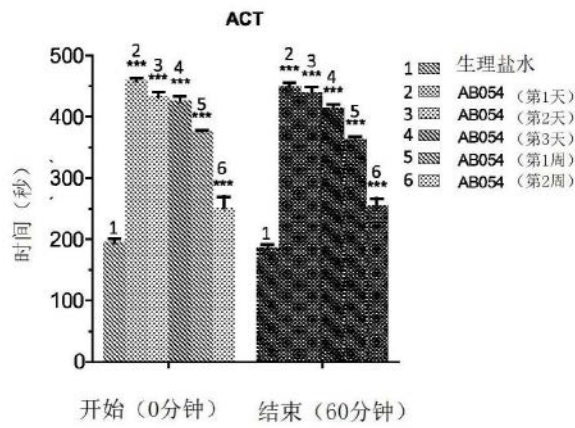


图20C

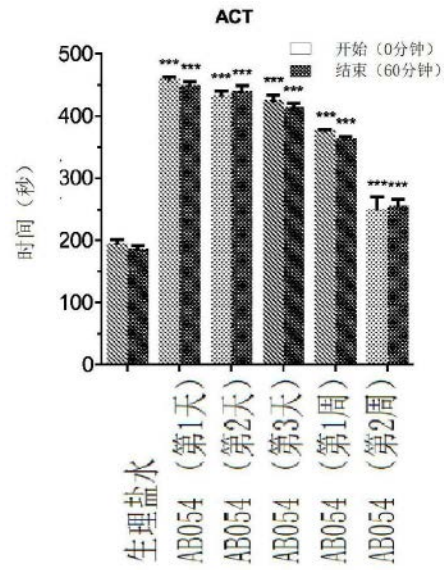


图20D

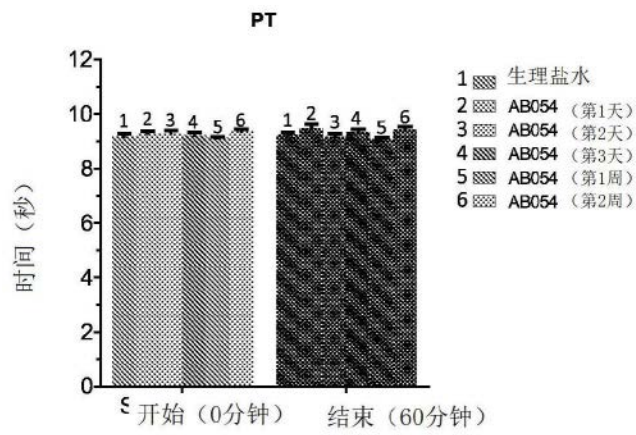


图21A



胶原蛋白移植

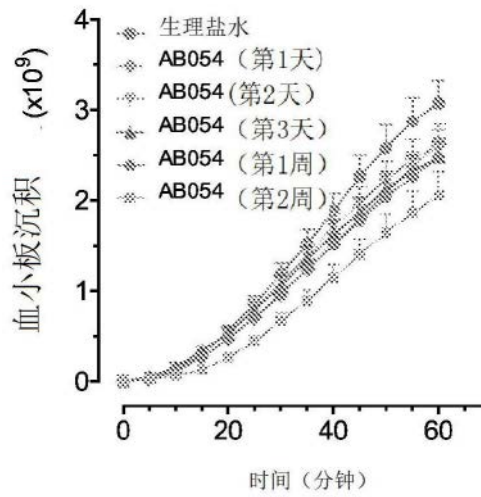


图23A

胶原蛋白尾巴

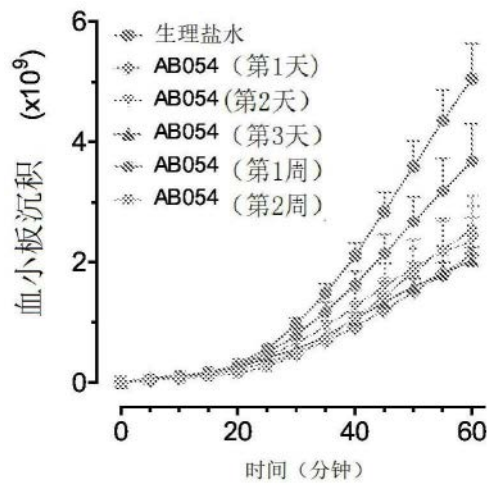


图23B

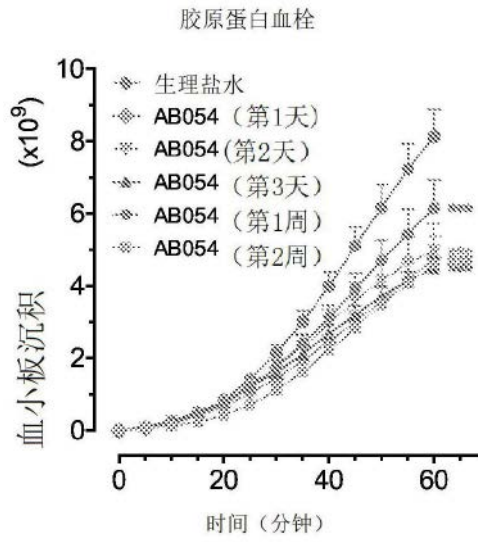


图23C

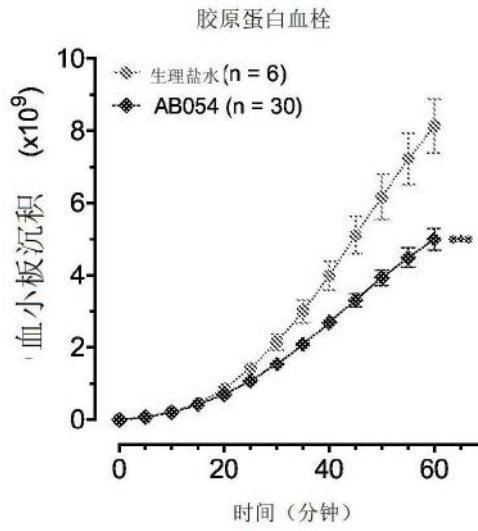


图23D

组织因子移植物

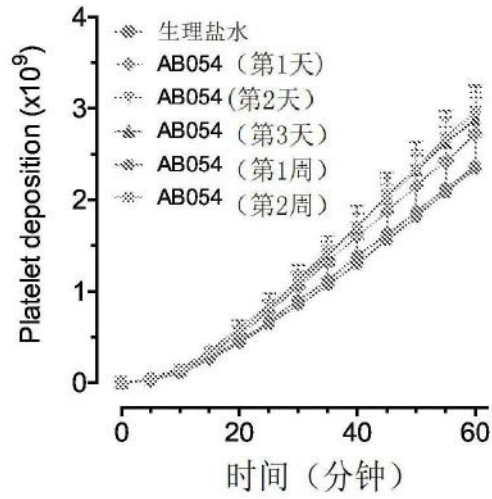


图24A

组织因子尾巴

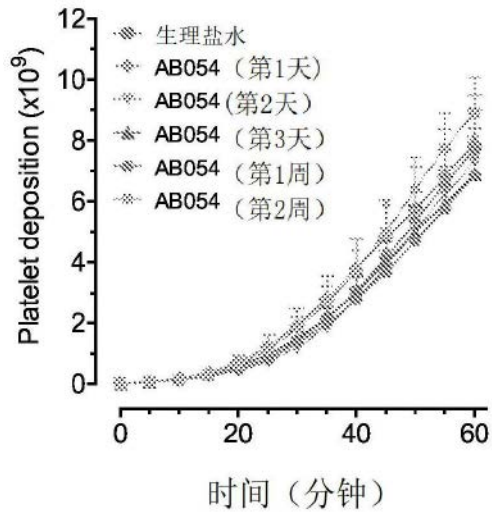


图24B

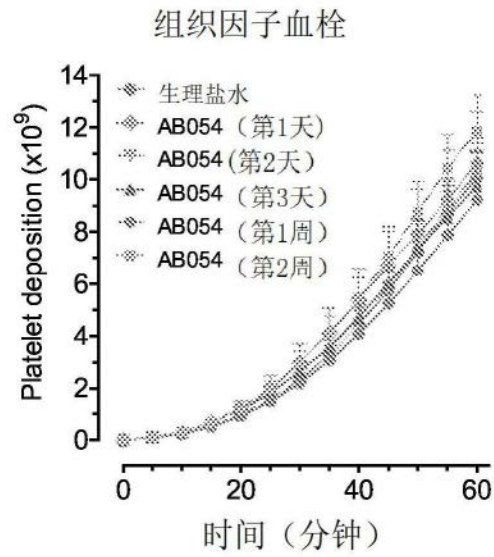


图24C

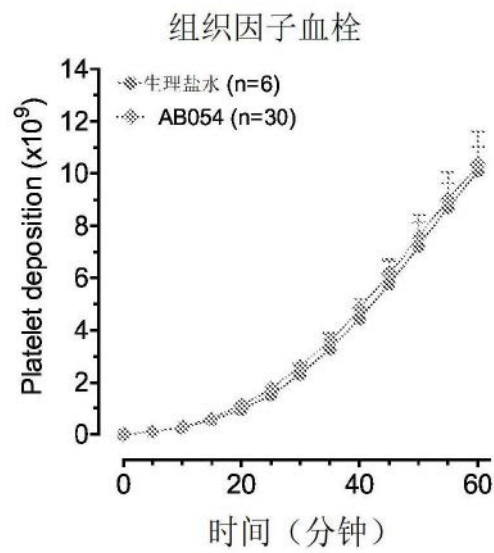


图24D

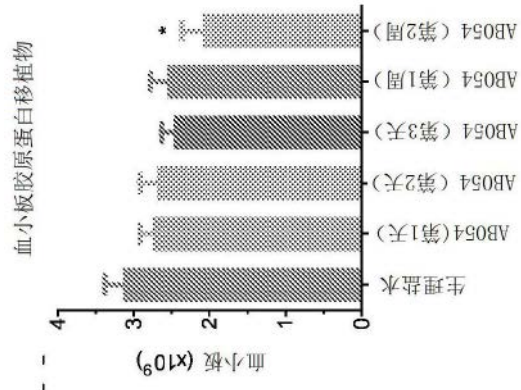


图25A

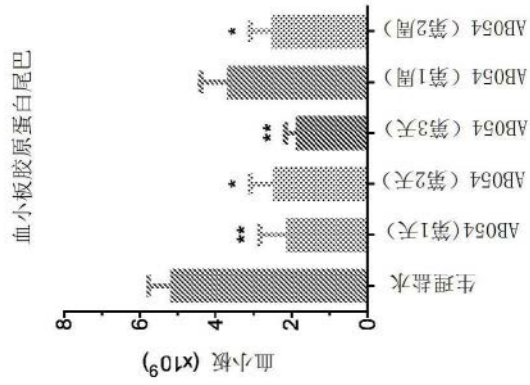


图25B

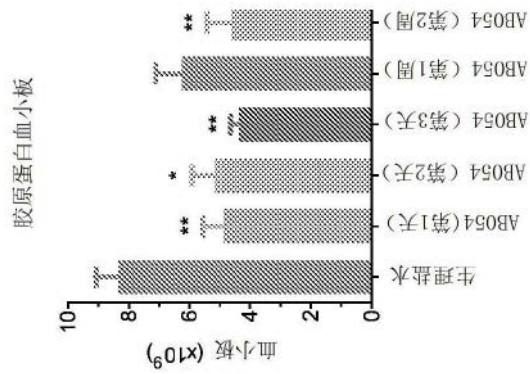


图25C

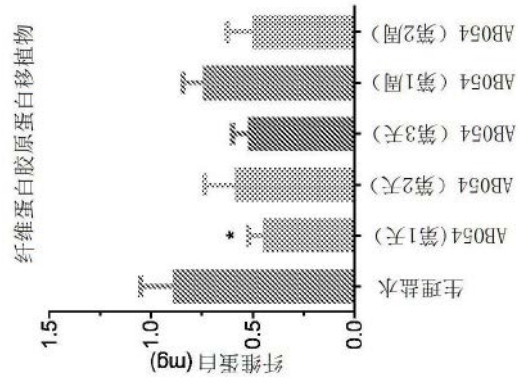


图25D

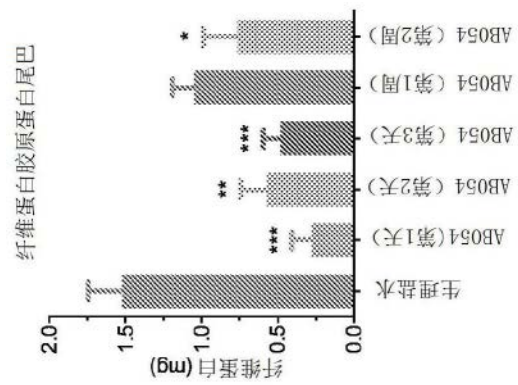


图25E

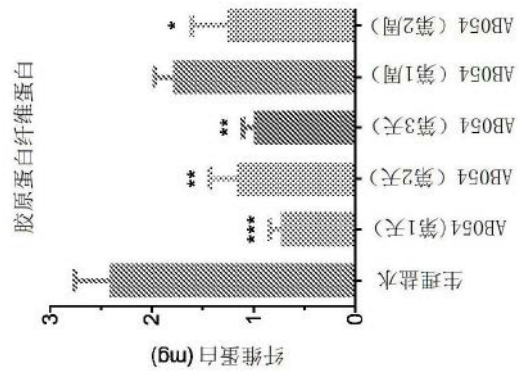


图25F

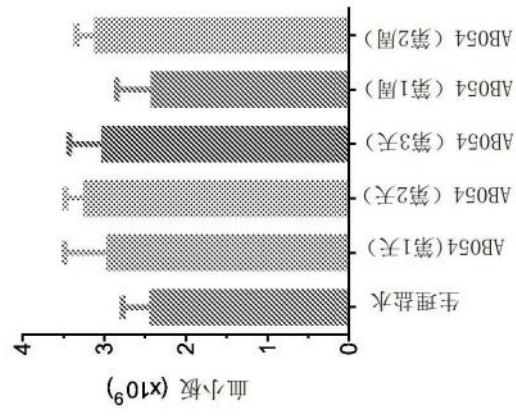


图26A

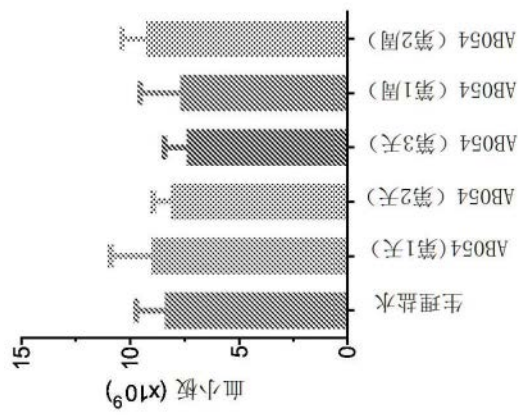


图26B

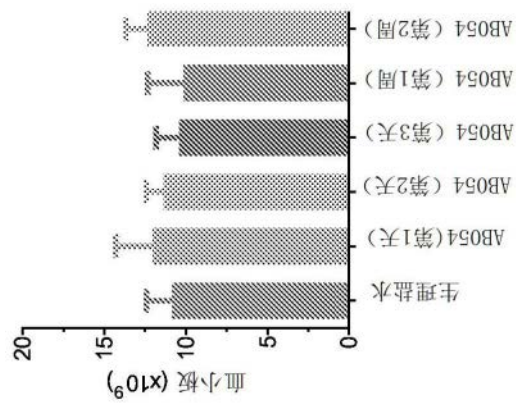


图26C

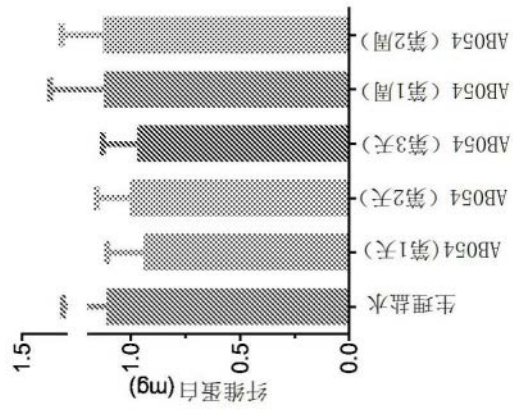


图26D

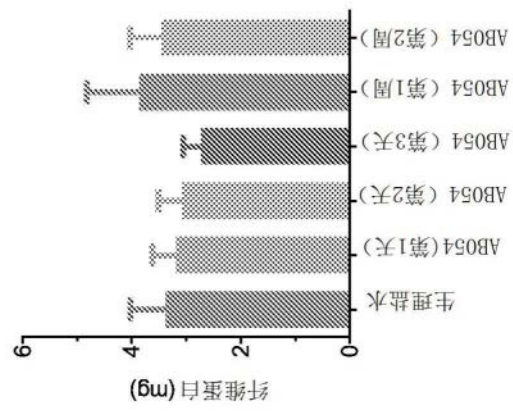


图26E

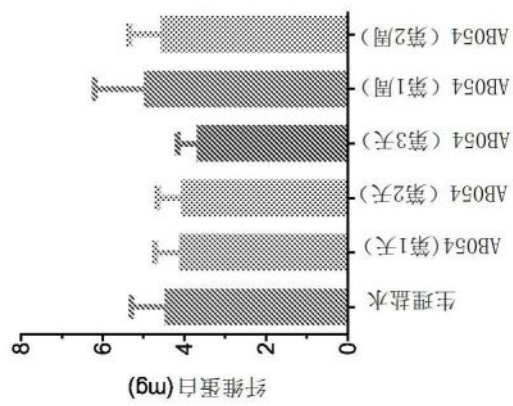


图26F

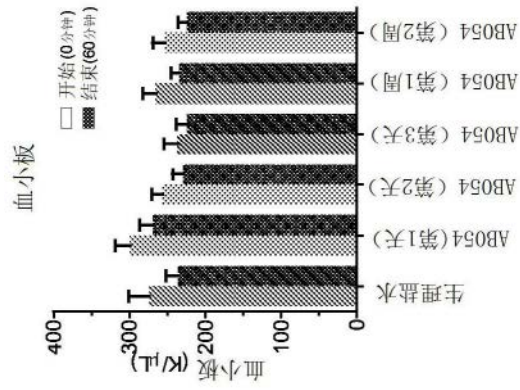


图27A

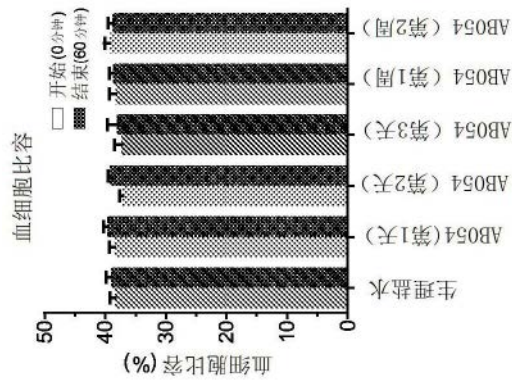


图27B

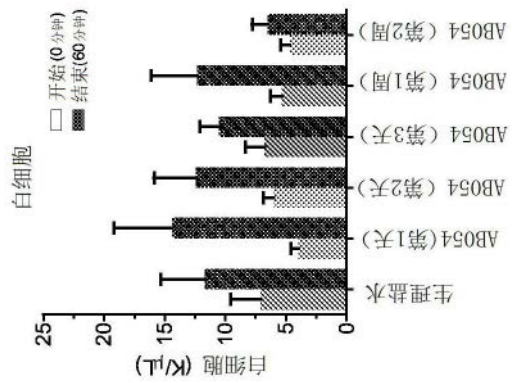


图27C

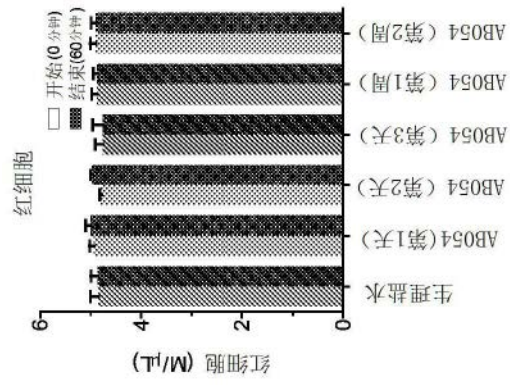


图27D

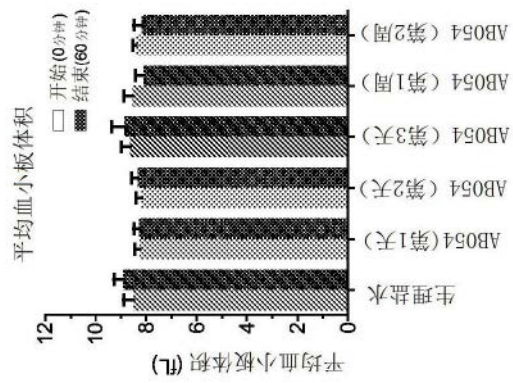


图27E